

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LE SORT DU BACILLE DE KOCH CHEZ LES SUJETS CLINIQUEMENT NON TUBERCULEUX

par A. SAENZ et G. CANETTI.

*(Laboratoire de recherches sur la tuberculose à l'Institut Pasteur
et Service du Dr Ameuille, à l'Hôpital Cochin.)*

Il est bien connu que lorsque le bacille de Koch pénètre à l'intérieur de l'organisme humain, il ne produit que dans une petite minorité de cas une maladie tuberculeuse cliniquement apparente. Habituellement, son action se limite à l'édification de petites lésions cliniquement latentes, dites de primo-infection ou de réinfection selon qu'elles surviennent chez des sujets exempts ou déjà porteurs d'atteintes tuberculeuses, lésions dont le caractère essentiel est d'évoluer de manière favorable vers la calcification et la sclérose.

La recherche de la virulence de ces lésions latentes, présentées chez la grande majorité des sujets adultes de nos pays, est d'un intérêt considérable. Elle ne l'est pas tant du point de vue diagnostique, la nature tuberculeuse de ces lésions étant déjà mise hors de doute par la caséification ou la calcification qu'elles présentent, que du point de vue bactériologique et pathologique.

Au point de vue bactériologique, l'exploration de ces lésions renseigne, d'une part, sur la durée de survie possible du bacille tuberculeux dans les organismes vivants, point que les tuber-

culoses expérimentales habituelles, portant sur des animaux à vie brève, ne permettent pas d'élucider. D'autre part, par l'identification des bacilles éventuellement rencontrés, elle fournit des indications utiles sur l'importante question de l'atténuation de virulence du bacille de Koch par un séjour prolongé dans les tissus.

Au point de vue pathologique, cette exploration n'est pas moins utile, puisqu'en montrant la présence ou l'absence de bacilles dans les lésions, elle renseigne sur la possibilité de leur réveil évolutif et, par là, contribue à élucider la fondamentale question de l'origine exogène ou endogène des tuberculoses évolutives. Enfin, elle soulève le problème du substratum bactériologique des réactions tuberculiniques.

Mais l'étude du bacille de Koch dans les tuberculoses latentes ne saurait se limiter à la recherche du bacille dans les seules *lésions* tuberculeuses. On sait, en effet, que le bacille peut se rencontrer dans des tissus macroscopiquement sains, dans les ganglions lymphatiques en particulier ; il faut donc adjoindre à l'exploration des lésions celle de fragments de tissus macroscopiquement sains pour que le bilan bacillaire des sujets atteints de tuberculose latente puisse prétendre à quelque exactitude.

De pareilles études, portant les unes sur les lésions tuberculeuses, les autres sur des tissus sains, d'autres sur les deux à la fois, ont déjà été entreprises par d'assez nombreux auteurs. La première en date semble être celle de I. Déjerine [8]. Cet auteur montre, dès 1884, que la partie centrale des calcifications pulmonaires rencontrées à l'autopsie des gens âgés ne contient presque jamais de bacilles tuberculeux à l'examen direct : 4 inoculations au cobaye restèrent négatives. Viennent ensuite les recherches de Kurlow [18], Loomis [19], Pizzini [27], dont les résultats sont inutilisables en raison de leur technique bactériologique défectueuse ; les mémoires de Kaelble [15], Mac Fadyean et Mac Conkey [22], Harbitz [14], Weichselbaum et Bartel [39], Gaffky [22], Weber et Baginsky [38], Rothe (cité par S. Griffith), Ungermann [35], Wang [36], tous consacrés à la recherche du bacille de Koch dans les ganglions sains d'enfants non tuberculisés ; les travaux de Schmitz [32], Weber [37], Lydia Rabinowitsch [21], montrant la persistance

possible du bacille tuberculeux dans les lésions crétacées et même calcifiées ; enfin, les remarquables mémoires de Eastwood et F. Griffith [9], ainsi que de Stanley Griffith [9] étudiant chez l'enfant, avec une technique bactériologique rigoureuse, des lésions tuberculeuses ainsi que des tissus sains.

Pour l'après-guerre, on relève les travaux de Koenigsfeld et Puhl [16], Schrader [33], Anders [2], consacrés à l'exploration de chancres d'inoculation calcifiés ; l'important mémoire d'Opie et Aronson [24] sur le bacille tuberculeux à l'état latent, le travail de Rubinstein et Triuss [28] sur les lésions apicales, le mémoire de Stanley Griffith [13] sur les types de bacilles de Koch rencontrés dans la tuberculose humaine — la question de la stérilisation des lésions s'y trouve incidemment traitée ; la thèse de Perrault [26] sur la dispersion bacillaire après primo-infection ; enfin, le tout récent travail de Feldman et Baggenstors [10] sur le complexe primaire.

Le présent mémoire a pour but, d'abord, de donner les résultats de recherches personnelles portant sur 207 lésions ou tissus provenant de 90 sujets, ensuite de coordonner ces résultats avec ceux des auteurs précités, en éliminant de ces travaux ceux menés à l'aide d'une technique bactériologique aujourd'hui insuffisante. On ne peut procéder autrement, car seule l'addition de tous les résultats valables permet d'obtenir, dans chacune des catégories, un nombre de cas suffisamment élevé pour que les effets du hasard se trouvent, au moins dans une certaine mesure, éliminés. L'importance du sujet exige que les conclusions reposent sur un fondement numérique solide.

Nous envisagerons successivement : le matériel étudié, les techniques employées, la valeur comparée de l'ensemencement et de l'inoculation ; puis, les résultats fournis par l'exploration des lésions tuberculeuses ; ceux fournis par l'exploration des tissus sains ; enfin, l'interprétation qu'il convient de donner à ces résultats et les enseignements qu'ils comportent pour la connaissance de l'évolution de l'infection tuberculeuse chez l'homme.

I. — MATÉRIEL, TECHNIQUES AUTOPSIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE, VALEUR COMPARÉE DE L'INOCULATION, ET DE L'ENSEMENCEMENT, CARACTÈRE PAUCIBACILLAIRE DES PRODUITS ÉTUDIÉS.

MATÉRIEL. — Les prélèvements ont été au nombre de 207, provenant de 90 sujets. De ces prélèvements, 184, provenant de 76 sujets, ont fourni des résultats positifs ou négatifs valables ; les animaux inoculés avec les 23 autres lésions sont décédés avant terme ; ces cas ne figurent pas sur les tableaux.

Il s'agissait toujours, sauf 8 fois, d'adultes ayant atteint ou dépassé la quarantaine (5 cas entre quarante et cinquante ans, 19 entre cinquante et soixante ans, 44 au-dessus de soixante ans), tous sujets exempts de maladies tuberculeuses cliniquement reconnues présentes ou passées, et décédés des affections les plus diverses.

Les fragments étudiés furent des nodules pulmonaires caséeux ou crétacés (11 fois), des chancres d'inoculation calcifiés (21 fois), des nodules de réinfection calcifiés (23 fois), des cicatrices apicales fibreuses (34 fois), des ganglions médiastinaux comprenant des calcifications (26 fois), des ganglions médiastinaux sans calcification (40 fois), des fragments de poumon sain (18 fois), de foie sain (10 fois) et de rate saine (10 fois). La seule difficulté qui se présente dans l'identification de ces lésions est la distinction entre chancre d'inoculation calcifié et nodule de réinfection calcifié : on la résout par l'étude des groupes ganglionnaires satellites, qui présentent des calcifications dans le premier cas et en sont exempts dans le second.

TECHNIQUE. — Les prélèvements étaient pratiqués aseptiquement, après nettoyage de la peau, à l'aide de gants et d'instruments stériles, ces derniers changés pour chaque nouveau prélèvement. La moitié du prélèvement était gardée pour l'examen histologique ; l'autre moitié, destinée à l'examen bactériologique, était coupée en petits fragments, broyée, traitée à l'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant trente minutes, d'après la technique préconisée par l'un de nous [31]. Puis le produit était divisé en deux parties égales, l'une destinée à l'ensemencement, l'autre à l'inoculation de 3 cobayes ; pour les 85 derniers prélèvements, l'ensemencement ne fut pratiqué qu'occasionnellement. Le nombre total de cobayes inoculés fut de 605.

L'évolution de la tuberculose était suivie chez ces animaux par la recherche périodique de l'allergie (intradermo-réactions effectuées avec

1/10 de centimètre cube de tuberculine brute au 1/10). Les cobayes survivants non allergiques étaient sacrifiés au bout du troisième mois. Il n'a pas été tenu compte des animaux décédés avant la fin du premier mois.

SENSIBILITÉ COMPARÉE DE LA CULTURE ET DE L'INOCULATION. CARACTÈRE PAUCIBACILLAIRE DE CERTAINS PRODUITS. — Les 99 premiers prélèvements (tous jusqu'au cas 62) furent étudiés simultanément par culture et par inoculation. L'inoculation donna 38 résultats positifs et 61 résultats négatifs. L'ensemencement donna 11 résultats positifs, 70 résultats négatifs et 18 infections par la flore secondaire. Il n'y eut pas un seul cas où la culture fût positive et l'inoculation négative. Il y eut 20 cas avec inoculation positive où le milieu de culture, non envahi par des germes d'infection secondaire, ne donna pas lieu à la croissance de bacilles de Koch. L'inoculation s'avère donc nettement supérieure à l'ensemencement.

Ces résultats n'ont rien de surprenant. Deux difficultés se présentent en effet lors de l'étude bactériologique de ces lésions : leur contamination par une flore secondaire importante et le caractère paucibacillaire de certains produits étudiés.

La forte contamination des lésions s'explique par le fait que les autopsies ne pouvaient souvent être pratiquées que quarante-huit à soixante-douze heures après le décès. La flore microbienne secondaire peut alors présenter un pullulement tel qu'elle n'est plus entièrement détruite par l'acide sulfurique à 15 p. 100 agissant pendant trente minutes, d'où infection des tubes ensemencés.

Quant au caractère paucibacillaire de certains produits étudiés, il est démontré tantôt par l'absence de généralisation des lésions des cobayes soixante-dix jours après l'inoculation (cas 47, 73, 78, 87), tantôt par l'absence de tuberculisation d'une partie des cobayes d'expérience malgré une survie prolongée (cas 19, 27, 49, 51, 59, 62, 73, 76, 78, 80, 89), tantôt, enfin, par une période antéallergique très longue, de cinquante à soixante-dix-sept jours, ce qui correspond, pour une souche de virulence normale, à l'inoculation d'une quantité de germes variant de 1/1.000.000 à 1/10.000.000 de milligramme. A cette dose, l'inoculation s'avère très supérieure à l'ensemencement, comme l'a montré l'un de nous.

Et il semble bien qu'il ne s'agisse pas de bacilles atténués, comme on pourrait le supposer, car le titrage de la virulence de plusieurs souches, issues des produits examinés, a montré qu'elles possédaient la virulence standard du bacille humain. Cependant, le nombre de souches étudiées par nous n'est pas encore suffisamment élevé pour que nous puissions nous prononcer formellement sur ce point. Nous l'étudierons dans un travail ultérieur.

II. — RÉSULTATS FOURNIS PAR L'EXPLORATION DES LÉSIONS TUBERCULEUSES.

Il convient d'étudier séparément les lésions caséuses, les lésions calcifiées et les lésions fibreuses. La caséification est le résultat de la pleine évolution de l'infection tuberculeuse. La calcification est le mode de guérison des lésions caséuses de quelque étendue (histologiquement, la calcification peut s'organiser et aboutir à l'ossification) ; la fibrose, enfin, est le mode de guérison de très petites lésions caséuses. Entre la caséification et la calcification se situe un état intermédiaire, l'état crétacé, qui ne comporte qu'une infiltration modérée du caséum en sels de chaux. Nous étudierons ensemble les lésions caséuses et crétacées, car leur âge n'est pas très différent, alors que des années séparent une lésion crétacée d'une lésion complètement calcifiée.

A. LES LÉSIONS CASÉUSES ET CRÉTACÉES. — Etant donné l'âge des sujets autopsiés, nous n'avons pu étudier que 11 lésions semblables (7 fois caséuses, 4 fois crétacées), provenant de 9 malades. Il s'agissait habituellement de nodules apicaux ou subapicaux de réinfection. Il y eut, pour les lésions caséuses, 6 résultats positifs et 1 résultat négatif ; pour les lésions crétacées, 1 cas positif et 3 cas négatifs. Signalons tout particulièrement le cas 30, où une lésion apicale droite se montra déjà stérilisée alors que la lésion gauche, elle aussi caséuse, était encore virulente.

La stérilisation de lésions encore caséuses a été observée par plusieurs auteurs.

Weber étudia par inoculation les ganglions mésentériques,

caséux, crétaés et aussi calcifiés de 39 enfants, et observe 22 cas positifs contre 17 cas négatifs.

Schmitz inocule 8 foyers crétaés, dont 6 pulmonaires et 2 ganglionnaires médiastinaux, et observe 6 résultats positifs, dont 5 pour les foyers pulmonaires et 1 pour le foyer ganglionnaire.

L. Rabinowitsch étudie 19 ganglions caséux mésentériques et bronchiques, dont 8 proviennent de tuberculoses mortelles. Sur les 11 lésions restantes, provenant de tuberculoses latentes de tous les âges, cet auteur obtient 5 résultats positifs et 6 négatifs.

Ungermann observe, sur 11 inoculations de ganglions mésentériques caséux et crétaés, provenant d'enfants âgés de moins de dix ans, 6 résultats positifs et 5 négatifs.

Dans les travaux de Eastwood et F. Griffith et de Stanley Griffith, portant sur des enfants âgés de moins de dix ans, on relève, chez les enfants non décédés de tuberculose, 19 inoculations de ganglions bronchiques caséux, avec 13 résultats positifs ; 20 inoculations de ganglions mésentériques caséux, avec 8 résultats positifs ; 11 inoculations de lésions pulmonaires caséuses, avec 2 résultats positifs, et 4 inoculations de lésions caséuses d'organes divers (foie, rate, amygdales), avec 1 résultat positif ; soit, au total, 54 inoculations avec 24 résultats positifs.

Opie et Aronson étudient par inoculation les lésions caséuses (encapsulées ou non) suivantes, provenant toutes d'adultes : 20 nodules pulmonaires subapicaux, avec 5 résultats positifs ; 21 lésions apicales, avec 16 résultats positifs, et 20 nodules de ganglions médiastinaux, avec 8 résultats positifs, soit, au total, 61 lésions avec 29 résultats positifs.

Stanley Griffith explore 176 cas de tuberculose ganglionnaire cervicale (dont 24 provenant de sujets âgés de plus de vingt ans), et trouve 133 résultats positifs contre 43 négatifs. Il s'agissait de ganglions caséifiés et « caséo-calcifiés », mais aussi de pus ganglionnaires. Ces lésions, provenant quelquefois de tuberculoses plus étendues, ne peuvent d'ailleurs être mises sur le même plan que les lésions de tuberculose latente seules envisagées dans cette étude.

Enfin, Rubinstein et Triuss observent, après inoculation et

TABLEAU I. — Les lésions caséuses et crétacées.

AUTEURS	LÉSIONS pulmonaires		LÉSIONS ganglionnaires		DIVERS (foie, rate)	
	Total	Cas négatifs	Total	Cas négatifs	Total	Cas négatifs
Weber	39	17				
Schmitz	6	5	2	1		
L. Rabinowitsch			11	5		
Ungermann			11	6		
Eastwood, F. Griffith et S. Griffith	11	9	39	19	4	3
Opie et Aronson	41	21	20	12		
Rubinstein et Triuss	7	1				
Saenz et Canetti	11	4				
	115	57	83	43	4	3

Total : 202 cas, dont 103 négatifs, soit 51 p. 100.

ensemencement de 7 lésions caséuses apicales provenant d'adultes, 6 résultats positifs.

Toutes ces recherches montrent à l'évidence que le bacille de Koch peut déjà être absent de lésions tuberculeuses très jeunes, datant de quelques semaines ou de quelques mois au plus. En additionnant les chiffres de tous les auteurs, on voit qu'il en a été ainsi 103 fois sur 202, soit dans la moitié des cas étudiés (tableau I).

On peut conclure que la stérilisation des lésions tuberculeuses commence d'assez bonne heure.

B. LES LÉSIONS CALCIFIÉES. — Nous avons étudié 70 lésions semblables, se décomposant en 21 chancres d'inoculation pulmonaires, 23 nodules de réinfection pulmonaires et 26 cas avec ganglions médiastinaux calcifiés. Mais ces dernières inoculations ganglionnaires comportaient toujours une quantité de tissu ganglionnaire sain ou fibreux infiniment plus importante que la calcification, circonstance très particulière qui oblige, nous verrons plus loin pourquoi, à assimiler ces inoculations à celles de ganglions médiastinaux sains, sans calcifications, et à ne pas les compter ici.

Restent donc les 44 nodules pulmonaires cités plus haut. L'inoculation comportait, outre le noyau central de chaux, sa

coque fibreuse, ainsi que la parcelle de tissu pulmonaire sain immédiatement environnante. Les 21 chancres d'inoculation donnèrent 5 résultats positifs ; les 9 nodules de réinfection apicaux, 2 résultats positifs, et les 14 nodules de réinfection non apicaux, 4 résultats positifs ; soit, au total, sur 44 inoculations, 11 résultats positifs et 33 résultats négatifs.

Les recherches d'autres auteurs montrent la même forte prédominance des cas négatifs sur les cas positifs.

Schmitz obtient, pour 16 foyers calcifiés des ganglions bronchiques, 6 résultats positifs, et pour 10 foyers calcifiés pulmonaires, 1 résultat positif.

Lydia Rabinowitsch observe, pour 30 inoculations de ganglions divers calcifiés, provenant de sujets non décédés de tuberculose, 11 cas positifs et 19 cas négatifs.

Koenigsfeld et Puhl inoculent 21 fois des chancres d'inoculation pulmonaires calcifiés qui leur fournissent 4 résultats positifs, et 18 fois les calcifications ganglionnaires homologues qui leur donnent 5 résultats positifs, soit 9 résultats positifs sur 39 foyers examinés.

Schrader étudie 101 calcifications pulmonaires et ganglionnaires de primo-infection chez 41 sujets âgés presque tous de plus de quarante ans, et exempts de toute réinfection. Cette étude, qui comporte à la fois l'inoculation et l'ensemencement pour les $\frac{4}{5}$ des cas, ne donne aucun résultat positif pour les 40 foyers pulmonaires, aucun résultat positif pour les 46 foyers ganglionnaires trachéo-bronchiques, et 1 résultat positif pour les 15 foyers ganglio-mésentériques. Il y a donc 1 résultat positif sur 101 cas.

Dans le travail d'Opie et Aronson, ne portant que sur des adultes, on trouve 77 inoculations de nodules pulmonaires calcifiés ou « caséo-calcifiés » avec 9 résultats positifs, 13 tuberculoses apicales identiques, avec 6 résultats positifs, et 91 nodules ganglionnaires, avec 21 résultats positifs, soit 183 lésions calcifiées ou « caséo-calcifiées », se montrant 36 fois virulentes.

Stanley Griffith [13] étudie 34 cas de tuberculose ganglionnaire mésentérique, dont 17 concernent des sujets cliniquement non tuberculeux. Il n'obtient aucun résultat positif pour les 17 ganglions calcifiés ou caséo-calcifiés inoculés.

TABLEAU II. — Les lésions calcifiées.

AUTEURS	LÉSIONS pulmonaires		LÉSIONS ganglionnaires	
	Total	Cas négatifs	Total	Cas négatifs
Schmitz	10	9	16	10
Lydia Rabinowitch			30	19
Koenigsfeld et Puhl.	21	17	18	13
Schrader.	40	40	61	60
Opie et Aronson	92	77	91	70
Stanley Griffith			17	17
Rubinstein et Triuss	27	16		
Anders.			58	50
Saenz et Canetti	44	33		
	234	192	291	239
Pourcentage		82		82

Total : 525 cas, dont 431 négatifs, soit 82 p. 100.

Rubinstein et Triuss [28] inoculent et ensemencent 27 foyers apicaux « pétrifiés » provenant d'adultes et obtiennent 11 résultats positifs.

Anders [2] explore, chez des adultes, selon une technique non indiquée, 44 calcifications de ganglions médiastinaux et 14 de ganglions mésentériques, toutes homologues du chancre d'inoculation ; il obtient 8 résultats positifs pour les premiers et n'obtient aucun résultat positif pour les seconds.

Signalons enfin le tout récent travail de Feldman et Baggenstoss [40], étudiant chez 68 sujets, dont les 2/3 âgés de plus de quarante ans, 41 nodules pulmonaires, 53 nodules ganglionnaires hilaires, 5 cicatrices apicales et 2 lésions diverses. Ils observent un seul résultat positif, fourni par un nodule pulmonaire. La technique de ces auteurs est d'ailleurs discutable, puisque, après broyage des lésions et addition d'eau physiologique, ils n'inoculent et n'ensemencent que le liquide surnageant, qui a toutes chances de ne pas contenir tous les bacilles éventuellement présents.

En additionnant tous les cas valables (tableau II), on obtient, pour 525 lésions étudiées, 94 résultats positifs, soit 82 p. 100 de résultats négatifs. Il est donc impossible de considérer,

comme le font encore beaucoup d'auteurs, que les lésions tuberculeuses calcifiées renferment habituellement des bacilles virulents. L'ensemble des constatations énumérées ci-dessus démontre, au contraire, de la manière la plus formelle, que les lésions calcifiées sont le plus souvent stériles.

C. LES LÉSIONS FIBREUSES. — Leur étude bactériologique n'a pas été très souvent entreprise. On ne peut s'en étonner, car rien ne permet d'affirmer *a priori* que de pareilles lésions sont réellement d'origine tuberculeuse. Elles peuvent relever de bien d'autres étiologies.

Il faut cependant faire une exception pour les fibroses de l'extrême sommet du poumon. Comme l'un de nous l'a montré ailleurs [7], il en existe deux catégories; les unes sans signes histologiques de nécrose, attribuables à la seule stase lymphatique; les autres avec nécrose en voie d'organisation et dues vraisemblablement à la tuberculose.

Nous avons exploré 34 fibroses apicales de la deuxième catégorie. Elles nous ont fourni 6 résultats positifs et 28 résultats négatifs.

Dans la littérature, on relève les résultats suivants :

Opie et Aronson obtiennent, pour 51 inoculations, 41 résultats positifs. Mais il y a lieu de remarquer que les lésions apicales étudiées par ces auteurs contenaient quelquefois des calcifications.

Böhne [5] n'observe pas un seul résultat positif sur 18 cas. Mais seul l'ensemencement était mis en œuvre, ce qui empêche de tenir compte de ce travail.

Rubinstein et Triuss ensemencent et inoculent 22 fibroses apicales, sans obtenir un seul résultat positif.

Enfin, Bessin [4] a 2 inoculations positives sur 27 cas. En additionnant les chiffres d'Opie et Aronson, Bessin, Rubinstein et Triuss et les nôtres, on obtient 49 résultats positifs pour 434 lésions étudiées, soit 85 p. 100 de résultats négatifs. Sans doute y a-t-il dans ces lésions quelques fibroses non tuberculeuses. Mais, même en tenant compte de cette cause d'erreur, on voit que les lésions tuberculeuses fibrosées ne contiennent des bacilles que dans une petite minorité de cas.

III. — RÉSULTATS FOURNIS PAR L'EXPLORATION DE TISSUS SAINS.

Avant d'entrer dans le détail des investigations consacrées à ce sujet, il importe de préciser ce que l'on entend par tissu sain.

On ne peut, en toute rigueur, prétendre rechercher la présence de bacilles virulents au niveau de tissus *histologiquement* sains, puisque les fragments étudiés histologiquement ne peuvent être les mêmes que les fragments inoculés. Si les fragments étudiés histologiquement montrent des bacilles acido-résistants, on ne peut savoir s'il s'agit de bacilles vivants, virulents ou atténués, ou morts ; et, inversement, l'on ne peut certifier que les fragments inoculés et trouvés virulents n'auraient pas montré de lésions histologiques de tuberculose. Il est donc impossible de démontrer avec certitude, comme certains auteurs ont prétendu le faire, qu'un bacille tuberculeux virulent peut se comporter à la manière d'un corps absolument inerte et inoffensif, sans action aucune sur le tissu qui l'environne.

On peut, par contre, chercher la présence de bacilles virulents au niveau de tissus *macroscopiquement* sains, c'est-à-dire exempts d'hypertrophie notable, de caséification, de calcification ou de sclérose. Tel est le cas de nos prélèvements de foie, de rate, de poumon, ainsi que de la plupart des ganglions médiastinaux. L'examen histologique négatif n'apporte qu'une présomption de plus, puisqu'il porte sur un fragment distinct. La présence de bacilles virulents dans de pareils tissus ne démontre avec certitude qu'une diminution des effets pathogènes, et non leur absence totale.

Enfin, on peut rechercher la présence de bacilles au niveau de tissus macroscopiquement altérés, mais dont l'altération est attribuable avec vraisemblance à une cause autre que la tuberculose. C'est le cas de certains ganglions médiastinaux présentant une fibrose étendue, parfois avec dégénérescence hyaline. L'accumulation ganglionnaire des poussières, et spécialement de la silice, suffit à produire ces altérations ; aussi peut-on les rencontrer chez des sujets n'accusant pas trace du

moindre contage tuberculeux, exempts de tout signe de primo-infection. La présence de bacilles dans de tels tissus n'implique donc rien de certain quant à leur action pathogène, sinon que la présence d'une autre cause suffisante la rend des plus improbables.

Nous avons étudié des fragments sains de foie, de rate, de poumons et de ganglions trachéo-bronchiques.

A. FOIE ET RATE. — 10 cas ont été examinés. Il s'agissait toujours de sujets présentant des séquelles tuberculeuses indiscutables au niveau des poumons ou des ganglions médiastinaux. Ni les 10 inoculations de foie, ni les 10 inoculations de rate, représentant un total de 60 animaux inoculés — 3 par échantillon étudié — ne donnèrent de résultat positif.

Dans le travail de Eastwood et F. Griffith et de Stanley Griffith, on trouve 4 inoculations de rate provenant d'enfants porteurs ailleurs de lésions caséuses non mortelles et 2 inoculations de rate provenant d'enfants absolument indemnes de toute tuberculose. Il n'y eut pas un seul résultat positif.

Dans la thèse de Perrault, on relève les inoculations de foie et de rate (ainsi que de nombreux autres viscères : rein, cerveau, surrénale, muscle) provenant de 7 nourrissons non primo-infectés, sans un seul résultat positif, ainsi que de 3 nourrissons primo-infectés, apparemment non décédés de leur tuberculose, avec un résultat positif pour la rate. Dans ce cas (nourrisson de treize mois décédé de diphtérie), les inoculations d'autres viscères demeurèrent négatives.

De l'ensemble de ces cas, numériquement très insuffisants il est vrai, il ressort que ni le foie, ni la rate ne renferment habituellement de bacilles, aussi bien chez les sujets porteurs des stigmates de la primo-infection que chez ceux qui en sont exempts. Mais ces recherches, étant donné la minime fraction de parenchyme exploré, ne représentent que de lointaines approximations.

B. POUMONS. — Nous avons inoculé 18 fois des fragments de poumons sains, provenant indifféremment du sommet ou de la base, à 52 cobayes au total. Il s'agissait 14 fois sur 18 de sujets présentant des cicatrices tuberculeuses pulmonaires,

dont 5 virulentes — le prélèvement de tissu sain était fait très à distance de la cicatrice — et 9 fois, de sujets présentant des bacilles au niveau de leurs ganglions médiastinaux. Sur les 18 cas, un seul fut positif (cas 92). Il s'agissait d'une femme de trente ans, décédée de leucémie aiguë, qui présenta à l'autopsie un nodule calcifié lobaire supérieur gauche et une cicatrice fibreuse apicale droite, cette dernière également virulente, de même que les ganglions médiastinaux sains. Les 17 autres cas furent négatifs.

Cette négativité de nos inoculations est en désaccord avec les recherches d'Opie et Aronson, portant, il est vrai, sur un nombre de cas plus élevé. Ces auteurs ont obtenu 17 résultats positifs sur 51 fragments de poumon sain, provenant de 30 malades presque tous porteurs de cicatrices pulmonaires. Il n'y a dans ces observations aucune particularité permettant d'expliquer le pourcentage particulièrement élevé de cas positifs. La question de la virulence de fragments pulmonaires sains reste donc ouverte.

C. GANGLIONS. — C'est sur les ganglions que les investigations les plus nombreuses ont porté. On peut en effet penser *a priori* que les bacilles, pénétrant dans l'organisme par inhalation ou ingestion, et n'y exerçant pas d'action pathogène notable, sont rapidement entraînés par le courant lymphatique vers les ganglions ; hypothèse que d'assez nombreuses inoculations positives viennent entièrement confirmer.

1° *Recherches personnelles.* — *Première série :* Nos recherches ont porté d'abord sur les ganglions médiastinaux macroscopiquement non tuberculeux de 40 adultes. Il s'agissait de ganglions ou entièrement normaux, ou anthracosiques (éventualité la plus fréquente), ou anthracosiques et fibreux, avec ou sans dégénérescence hyaline, modification souvent observée chez les sujets âgés et attribuable à la seule accumulation ganglionnaire des poussières, comme nous l'avons dit plus haut.

La technique adoptée était la suivante : par une dissection minutieuse, tous les ganglions efférents du poumon étaient prélevés, aussi bien ceux du hile que ceux des groupes paratrachéaux droit et gauche et du groupe de la bifurcation. On

obtenait ainsi une vingtaine de ganglions ou de masses lymphoïdes, parfois davantage. De *chaque* ganglion, un fragment était excisé ; tous les fragments étaient broyés ensemble et inoculés après traitement. Le broyat, toujours d'un volume considérable, contenait donc des fragments de *tous* les ganglions efférents du poumon (sauf des ganglions paraortiques, recevant quelques lymphatiques de la base).

2 fois il s'agissait de sujets ne présentant nulle trace de cicatrices tuberculeuses, 19 fois de sujets qui en présentaient au niveau des poumons, et 18 fois de sujets qui présentaient dans le médiastin, outre les ganglions sus-décrits, des ganglions calcifiés (de 1 à 3, rarement plus), ganglions calcifiés qui étaient soigneusement éliminés de l'inoculation.

Il y eut, pour ces 3 variétés d'expériences, respectivement 1, 12 et 13 résultats positifs. *Au total, les 40 inoculations fournirent 26 résultats positifs, soit 65 p. 100 de cas positifs.* C'est là un pourcentage considérable. On ne saurait l'attribuer à un défaut d'asepsie ou à quelque erreur de technique. Car s'il y avait eu une cause d'erreur par excès, elle aurait dû jouer non seulement pour les ganglions médiastinaux, mais aussi pour toutes les autres inoculations provenant des 26 cas positifs ; or, ces autres inoculations, au nombre de 22, donnèrent 16 résultats négatifs, contre 6 résultats positifs seulement. Les bacilles trouvés provenaient donc bien des ganglions médiastinaux. Cette constatation nous retiendra longuement par la suite.

Seconde série : Nous avons étudié identiquement, chez 26 sujets, la totalité des ganglions médiastinaux sains, mais en y ajoutant les ganglions calcifiés également présents au niveau du médiastin. La technique était la même que précédemment, sauf que l'on ajoutait à l'ensemble du broyat de tissu sain les calcifications ganglionnaires rencontrées. Il y eut, pour les 26 cas, 15 résultats positifs et 11 résultats négatifs.

Ce taux de résultats positifs — 58 p. 100 — est sensiblement le même que précédemment. Or, on se rappelle que les calcifications étudiées isolément se montrent virulentes à peine dans $1/3$ des cas. Le rapprochement de ces deux chiffres — 58 p. 100 de résultats positifs pour les mélanges de ganglions sains et calcifiés, à peine 20 p. 100 pour les

calcifications isolées — montre à l'évidence que dans la grande majorité des cas les bacilles décelés dans les mélanges ganglionnaires provenaient des ganglions sains et non des calcifications. *Il apparaît ainsi que la si fréquente virulence des ganglions médiastinaux de l'adulte n'est nullement liée à la présence de calcifications dans ces ganglions ; qu'il y ait calcification ou non, le taux de résultats positifs est le même.*

Il faut enfin souligner que même avec l'énorme quantité de tissu inoculée dans ces 2 séries d'expériences, les tuberculoses conférées au cobaye étaient parfois d'une très faible intensité, dénotant la nature paucibacillaire du produit inoculé. La plupart des tuberculoses torpides du cobaye signalées plus haut, provenaient en effet d'inoculations ganglionnaires : ainsi les 4 cas de généralisation des lésions du cobaye après soixante-dix jours, et 9 des 12 cas d'absence de tuberculisations d'une partie des cobayes inoculés. Les 41 inoculations ganglionnaires positives donnèrent ainsi lieu 11 fois à des tuberculoses aussi peu graves, alors que toutes les autres inoculations positives, au nombre de 24, n'en donnèrent que 3 fois, soit proportionnellement 2 fois moins souvent.

Il n'y a donc que très peu de bacilles dans ces ganglions médiastinaux sains. Il est vraisemblable que tous les ganglions n'en contiennent pas, et que ceux qui en contiennent n'en hébergent que quelques unités.

2° *Recherches d'autres auteurs sur des ganglions sains d'adultes.* — En laissant de côté les travaux de Loomis et de Pizzini, d'une technique insuffisante, on ne relève dans la littérature qu'un seul travail sur ce sujet, celui d'Opie et Aronson. Ces auteurs ont pratiqué 36 inoculations de ganglions provenant de 29 sujets, presque tous porteurs de cicatrices tuberculeuses du poumon. Il y eut 9 résultats positifs observés chez 7 sujets, soit 25 p. 100 de résultats positifs.

Ce taux, nettement inférieur au nôtre, s'explique sans doute par la différence de technique employée. Les auteurs n'inoculaient en effet chaque fois que des prélèvements de plusieurs ganglions, non de tous. Il y a là une différence considérable, puisque, comme nous venons de le montrer, les bacilles ne sont vraisemblablement présents que dans quelques ganglions. Les auteurs démontrent d'ailleurs eux-mêmes qu'il en est

ainsi, car 3 de leurs cas positifs comportent 2 inoculations ganglionnaires faites séparément ; et chaque fois les résultats des inoculations sont discordantes, l'une positive et l'autre négative. Ainsi, il faut étudier des prélèvements de tous les ganglions pour établir le taux véritable de cas positifs, et encore ne s'agit-il que d'une approximation par défaut.

3° *Recherches sur des ganglions sains d'enfants.* — Il y a un grand nombre de travaux d'avant-guerre sur ce sujet (dont certains comportent quelques cas d'adultes).

Kaelblé inocule des fragments de ganglions bronchiques de 23 sujets exempts de toute cicatrice tuberculeuse et obtient 2 résultats positifs (l'un chez un homme de quarante et un ans, l'autre chez un enfant de cinq ans).

Mac Fadyean et Mac Conkey inoculent des fragments de ganglions mésentériques de 20 sujets exempts de tuberculose, âgés tous de moins de huit ans. Ils obtiennent 5 résultats positifs.

Harbitz étudie les ganglions sains de 91 enfants ne montrant pas trace de tuberculose. 16 inoculations de ganglions bronchiques donnent 3 résultats positifs ; 24 inoculations de ganglions mésentériques, 3 résultats positifs, et 49 inoculations de ganglions cervicaux, 15 résultats positifs. Au total, sur 91 sujets, 18 hébergent des bacilles virulents : 15 fois 1 seul groupe ganglionnaire était virulent, 1 fois les 3 groupes étudiés, et 2 fois 2 groupes. 10 de ces 18 enfants étaient âgés de moins de un an.

Weber et Baginsky étudient 26 enfants âgés de trois mois à douze ans et exempts de signes anatomiques de tuberculose. L'inoculation séparée des ganglions cervicaux, bronchiques, mésentériques et des amygdales ne leur donne qu'un seul résultat positif, concernant les ganglions cervicaux d'un enfant de deux ans et demi élevé au lait de vache.

Weichselbaum et Bartel étudient 68 enfants âgés de sept mois à cinq ans et exempts de toute trace anatomique de tuberculose. Le nombre exact d'inoculations de chaque groupe n'est pas donné. Les auteurs obtiennent 5 résultats positifs pour les ganglions cervicaux, 3 pour les ganglions broncho-médiastinaux, et 2 pour les mésentériques ; au total, sur 68 sujets, 8 contiennent des bacilles virulents.

Une série particulièrement importante est celle de Gaffky. Cet auteur inocule séparément des ganglions mésentériques et bronchiques de 267 enfants âgés de moins de treize ans, et exempts de tout signe de tuberculose. Le seul groupe mésentérique se montre positif 6 fois ; le seul groupe médiastinal, 12 fois ; les 2 groupes simultanément, 12 fois. Au total 30 enfants sur 267 hébergeaient des bacilles virulents. Ici encore il s'agissait d'infections paucibacillaires : sur les 143 cobayes inoculés avec les produits positifs, 70 seulement furent tuberculisés.

Ungermann, dans un travail d'une précision remarquable, obtient les résultats suivants pour les inoculations séparées des ganglions bronchiques, mésentériques et cervicaux de 131 enfants, anatomiquement exempts de tuberculose et âgés de moins de dix ans ; 3 résultats positifs pour les ganglions bronchiques, 2 pour les ganglions mésentériques, 1 pour les cervicaux ; au total, 4 sujets positifs sur 131 ; 1 fois l'ensemble des 3 groupes est trouvé virulent ; les 3 autres fois, 1 seul des 3 groupes étudiés.

Rothe (cité par Stanley Griffith) obtient chez 78 enfants exempts de toute tuberculose anatomique et âgés de moins de cinq ans, 5 résultats positifs. Le détail des groupes ganglionnaires virulents n'est pas donné.

Le travail d'Eastwood et F. Griffith et de Stanley Griffith contient des indications particulièrement détaillées sur ce sujet. Ces auteurs ont, d'une part, étudié 96 enfants, presque tous âgés de moins de dix ans, et sans trace anatomique de tuberculose. 90 inoculations de ganglions bronchiques ont donné 4 résultats positifs ; 8 inoculations de ganglions cervicaux, 1 résultat positif, et 93 inoculations de ganglions mésentériques, 4 résultats positifs ; au total, sur 96 sujets, 7 furent trouvés porteurs de bacilles virulents. 1 fois, tous les 3 groupes l'étaient.

Dans ce même travail, on trouve d'autre part des inoculations de ganglions sains de 28 enfants présentant ailleurs des nodules tuberculeux caséux latents. Sur 19 inoculations de ganglions bronchiques, 5 furent positives ; sur 12 inoculations de ganglions mésentériques, 2 furent positives, et une inoculation de ganglions cervicaux se montra également positive. Au

TABLEAU III. — La virulence de ganglions sains d'enfants.

AUTEURS	GANGLIONS médias- tinaux		GANGLIONS mésenté- riques		GANGLIONS cervicaux		ENSEMBLE des enfants examinés	
	Total	Cas positifs	Total	Cas positifs	Total	Cas positifs	Total	Cas positifs
Kaelble	22	1					22	1
Mac Fadyean et Mac Conkey. . .			20	5			20	5
Harbitz	16	3	24	3	49	15	91	18
Weber et Baginsky	26	0	26	0	26	1	25	1
Weichselbaum et Bartel							6	8
Gaffky	267	24	267	18			267	30
Ungermann	131	3	131	2	131	1	131	4
Rothe							78	5
Eastwood, F. Griffith et S. Griffith.	90	4	93	4	8	1	96	7
Wang	5	0	15	1	4	0	15	1
Total	557	35	576	33	218	18	814	80
Pourcentage		6,3		5,7		8,2		9,8

total, sur ces 27 sujets, primo-infectés mais non tuberculeux au sens clinique du mot, 7, soit 26 p. 100, hébergeaient des bacilles virulents dans certains de leurs ganglions sains.

Citons, pour terminer, le travail de Wang. Cet auteur étudie chez 15 enfants et adolescents, âgés de moins de vingt ans et exempts de toute trace anatomique de tuberculose, 4 groupes ganglionnaires cervicaux, 5 bronchiques et 13 mésentériques. Il obtient un seul résultat positif concernant un groupe mésentérique. Chez 14 adultes, l'étude de 8 groupes cervicaux, 8 groupes bronchiques, 10 mésentériques et 1 groupe juxta-pancréatique donne 2 résultats positifs, concernant un groupe cervical ainsi que le groupe juxta-pancréatique.

Le tableau III résume tous les chiffres obtenus chez des enfants ; nous ne tenons compte ici que de sujets exempts de toute trace anatomique de tuberculose, pour ne comparer que des choses comparables.

Dans ces conditions on voit que, sur 814 enfants examinés, 80 ont présenté des bacilles virulents au niveau de certains groupes ganglionnaires sains. Ce taux de 10 p. 100 est loin d'être négligeable. Nous verrons plus loin l'importance doctrinale qui lui revient.

IV. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS. ENSEIGNEMENTS QU'ILS COMPORTENT POUR LA CONNAISSANCE DE L'INFECTION TUBERCULEUSE CHEZ L'HOMME.

Les résultats des nombreuses recherches qui viennent d'être rapportées peuvent paraître, de prime abord, déconcertants. Stérilité fréquente de lésions indiscutablement tuberculeuses, virulence fréquente de tissus macroscopiquement sains, il y a là une contradiction qui appelle des éclaircissements. Peut-on, par un essai de synthèse marquant la place de chacun de ces phénomènes, aboutir à une explication rationnelle des choses ?

1° Le fait qui se dégage le plus clairement des recherches apportées est la *stérilisation progressive* des lésions tuberculeuses. Elle s'observe déjà pour les lésions caséeuses et devient la règle, avec moins de 20 p. 100 d'exceptions, pour les lésions calcifiées ou fibreuses.

Cette stérilisation est indépendante du *stade de l'infection* tuberculeuse auquel est survenue la lésion. Elle s'observe avec la même fréquence pour les chancres d'inoculation de la primo-infection que pour les nodules de la réinfection, à condition que leur maturité histologique soit la même.

La stérilisation est également indépendante du *siège de la lésion* tuberculeuse. Elle se produit aussi souvent pour les lésions du poumon et des viscères que pour les lésions des ganglions.

La stérilisation s'observe enfin, quel que soit l'*âge des sujets* porteurs des lésions. Mais, ici, une remarque s'impose. On ne peut manquer d'être frappé, pour les lésions caséeuses, par l'absence presque totale de résultats négatifs dans les séries de Rubinstein et Triuss, de Schmitz, de la nôtre, *portant uniquement sur des adultes*, et au contraire par la fréquence des résultats négatifs — plus de la moitié des cas — dans les travaux de Weber, Eastwood et F. Griffith, S. Griffith, *portant uniquement sur des enfants*. Il semble bien que les lésions des adultes se stérilisent plus lentement que celles des enfants. Lorsque le stade de la calcification est atteint, les différences s'effacent ; mais ce stade (et le stade ultérieur d'ossification)

est justement plus lentement atteint chez l'adulte que chez l'enfant, ralentissement de la cicatrisation qui n'est qu'un cas particulier du ralentissement général des phénomènes biologiques avec l'âge. On peut admettre que la stérilisation plus lente des lésions de l'adulte n'est que le corollaire de leur plus longue persistance à l'état caséeux.

Enfin, la stérilisation *ne se produit pas pour un petit nombre de lésions*, même calcifiées ou fibrosées. A ce sujet, Opie et Aronson admettent que les bacilles mis en évidence par l'inoculation de ces lésions, proviennent en réalité du tissu sain environnant, simultanément inoculé. Cette assertion n'est pas démontrable en toute rigueur, car on ne peut séparer de manière rigoureusement aseptique le noyau de chaux du tissu pulmonaire environnant, pour les inoculer séparément. Mais il y a lieu de remarquer que le centre des calcifications est souvent un peu mou, et surtout, qu'il y survient souvent de l'ossification, ce qui démontre que même dans les lésions les plus chargées en chaux — et justement dans celles-là — il se produit des échanges nutritifs. Si ces échanges peuvent édifier de l'os, on ne voit pas pourquoi ils ne permettraient pas à quelques bacilles de végéter. Le problème du siège exact de ces bacilles n'est donc pas résolu, ni celui des causes de leur persistance de vitalité. Mais, de toute manière, il ne s'agit que d'une faible minorité de cas, à peine 1/5.

2° Si on envisage maintenant la notion de *l'existence de bacilles au niveau du tissu sain*, on peut faire les remarques suivantes :

De pareils bacilles peuvent se rencontrer à *tous les âges*, chez des nourrissons de quelques semaines aussi bien que chez des vieillards de quatre-vingts ans. Mais nos résultats, ainsi que ceux de Opie et Aronson, comparés à ceux des auteurs ayant étudié des ganglions d'enfants, montrent que la virulence de ganglions sains est beaucoup plus fréquente chez l'adulte que chez l'enfant. Nous verrons plus loin que cette prédominance chez l'adulte n'est pas en rapport avec le fait qu'il est habituellement porteur de cicatrices tuberculeuses, alors que l'enfant ne l'est souvent pas.

La virulence s'observe *beaucoup plus souvent pour le tissu ganglionnaire* que pour tout autre tissu. Chez l'enfant, les

ganglions cervicaux, médiastinaux et mésentériques sont à peu près également pris. On ne peut d'ailleurs comparer à ce point de vue les résultats des différents auteurs, car le groupe ganglionnaire atteint est vraisemblablement en étroit rapport avec la voie d'arrivée digestive ou respiratoire du bacille, elle-même fonction de la fréquence de la consommation de lait cru dans chaque pays. On connaît, à ce sujet, les énormes différences existant par exemple entre l'Angleterre, l'Ecosse et les pays nordiques d'une part — pays où le lait se consomme fréquemment cru — et la France, d'autre part, où le lait se consomme cuit. — Chez l'adulte, nous ne pouvons faire état que d'inoculations de ganglions médiastinaux.

La présence de bacilles virulents dans les tissus sains peut s'observer à tous *les stades anatomiques* de l'infection tuberculeuse ; avant la survenue de la lésion de primo-infection, pendant, après ; au moment de la survenue des lésions de réinfection, et bien après.

La virulence de ganglions avant toute lésion de primo-infection est un fait particulièrement remarquable. Peut-il s'agir d'une erreur, le complexe primaire ayant simplement passé inaperçu lors des autopsies ? Il est certain que la lésion primaire n'est pas toujours facile à trouver. Mais, remarquons que la plupart des recherches rapportées étaient spécialement entreprises en vue d'élucider ce problème et comportaient donc des autopsies particulièrement minutieuses ; d'autre part, il ne s'agissait que d'enfants, et chez l'enfant la lésion primaire est bien plus facile à trouver que chez l'adulte. Si quelques erreurs ont donc pu se glisser dans les 814 cas rapportés, on ne saurait penser que tous les 80 cas positifs en soient. *Ainsi, la primo-infection anatomique semble bien être précédée quelquefois d'une primo-infection purement bactériologique, dont on ne peut encore préciser ni la fréquence réelle, ni la durée, ni l'évolution ultérieure.* On peut d'ailleurs admettre que certains des cas positifs, résultant d'une contamination très récente, se trouvaient encore au stade préanatomique habituel de la tuberculose.

La virulence de ganglions sains aux stades ultérieurs de la tuberculose, stades avec lésions de primo-infection ou de réinfection, est formellement démontrée par les recherches d'East-

wood, F. Griffith et Stanley Griffith, d'Opie et Aronson, ainsi que par les nôtres. Le premier de ces travaux donne, chez des enfants, 26 p. 100 de résultats positifs ; le second, chez des adultes, 25 p. 100 ; le nôtre, avec la technique particulière que nous avons indiquée, 65 p. 100.

3° Une fois ces données établies, le problème capital qui reste à résoudre est celui de *l'origine des bacilles trouvés dans les ganglions sains*. S'agit-il des mêmes bacilles que ceux responsables des lésions tuberculeuses, ou s'agit-il au contraire de bacilles distincts, pénétrés dans l'organisme à la faveur d'une contamination différente ?

Il est très difficile de répondre à cette question.

La seconde éventualité serait démontrée de manière formelle et directe si l'on arrivait souvent à isoler chez un même sujet, d'une lésion tuberculeuse encore virulente et de ganglions sains, deux types de bacilles différents. A notre connaissance, de pareilles observations n'existent pas encore, bien qu'il en existe quelques-unes où *deux lésions tuberculeuses* relevaient de deux types bacillaires différents, humain et bovin, comme l'un de nous l'a constaté avec Coste et Costil [30]. Par contre, l'isolement habituel, à partir de la lésion tuberculeuse et des ganglions sains, de deux souches bacillaires du même type, ne permet aucune conclusion, puisqu'il n'y a, à l'heure actuelle, aucun moyen sûr de démontrer l'identité ou la différence de deux souches bacillaires également virulentes et appartenant au même type.

Il faut donc essayer de résoudre le problème de manière indirecte. Une considération très importante vient à l'esprit : l'état des lésions tuberculeuses concomitantes. Y a-t-il toujours de semblables lésions dans les organes dont les ganglions virulents sont satellites, et surtout ces lésions, de même que les autres éventuellement présentes dans l'organisme, se montrent-elles habituellement virulentes ? S'il en est ainsi, il est raisonnable d'admettre que les bacilles rencontrés dans les ganglions sains proviennent bien des lésions tuberculeuses.

Nos observations, ainsi que celles des auteurs anglais, permettent de répondre à ces questions. Dans le travail des auteurs anglais, on relève tout d'abord, chez des sujets porteurs de lésions tuberculeuses dont les ganglions mésentériques sains

étaient inoculés, 2 cas positifs sur 12. Dans les 2 cas, il y avait ailleurs — au poumon — des lésions caséuses virulentes. Une fois, il est vrai, il y avait absence de lésions intestinales, mais ce fait est de règle pour l'intestin, dont le bacille de Koch peut franchir la muqueuse sans laisser trace de son passage.

Mais il y a, par contre, d'importantes discordances pour les ganglions bronchiques. Sur 19 cas étudiés, 5 furent trouvés positifs. Or, une fois seulement (cas 102 de Eastwood et F. Griffith), il existait dans le poumon un nodule caséux, et ce nodule se montra déjà stérile. Dans les 4 autres cas, il n'existait aucune lésion dans les poumons : 2 fois il n'y avait que des caséifications des ganglions mésentériques qui étaient encore positives, 1 fois une lésion caséuse de la rate et 1 fois des lésions caséuses des ganglions cervicaux, mésentériques et de la rate, lésions qui se montrèrent, dans les 2 cas, toutes négatives. Ainsi, 4 fois sur les 5 cas positifs, les ganglions bronchiques sains étaient virulents, *en l'absence de toute lésion pulmonaire*, et 2 fois ils l'étaient, alors que les lésions caséuses existant à distance s'étaient déjà stérilisées.

Les divergences entre l'état des lésions tuberculeuses et des ganglions sains s'accroissent encore si on considère notre travail. Nous avons obtenu 26 inoculations positives de ganglions médiastinaux sains. En laissant de côté 2 cas insuffisamment explorés quant à l'existence de cicatrices pulmonaires (cas 19 et 20), il reste 24 cas, dont 2 seulement ne montrèrent pas trace de cicatrice tuberculeuse du poumon (l'un d'entre eux, le cas 78, n'en montrait même nulle part ailleurs) : les 22 autres cas en présentaient. Remarquons que sur les 14 cas d'inoculation négative de ganglions médiastinaux sains, 12 en présentaient également. Mais, si l'on envisage maintenant *l'état bactériologique* de ces cicatrices pulmonaires, on trouve que, sur 23 cicatrices étudiées chez 17 sujets, 6 seulement, appartenant à 5 sujets, se montrèrent positives, et 17 provenant de 12 sujets furent négatives. Ainsi, chez 12 sujets, les ganglions médiastinaux macroscopiquement sains étaient trouvés virulents alors que les lésions tuberculeuses du poumon, elles, s'étaient déjà stérilisées.

Devant un pareil état de choses, où l'on voit des ganglions virulents coexister très souvent avec des cicatrices stériles, on

ne peut plus penser que, dans tous les cas, les bacilles des ganglions sains sont les mêmes que ceux responsables des lésions tuberculeuses. Comment pourrait-il en être ainsi ? Il faudrait admettre que là où l'apport bacillaire a été suffisamment important pour produire une lésion caséuse, la stérilisation a pu être totale, tandis que là où ne s'est produite qu'une embolie microbienne très faible, insuffisante pour produire une lésion macroscopiquement visible, une stérilisation infiniment plus facile n'a pas pu s'effectuer ! Il est déraisonnable d'admettre cela. Dès lors, on doit penser que *chez les sujets dont les lésions tuberculeuses se sont stérilisées, les bacilles présents dans les ganglions sains proviennent de contaminations distinctes de celles responsables des lésions tuberculeuses.*

Ainsi, les faits apportés par le travail des auteurs anglais et par le nôtre, montrent à l'évidence que l'organisme humain peut héberger des bacilles tuberculeux autres que ceux de la primo-infection. La chose mérite d'être soulignée, car bien des auteurs pensent qu'il ne peut en être ainsi. Il en est, au contraire, souvent ainsi, d'autant plus souvent qu'il s'agit de sujets plus âgés. Dans le travail de Eastwood et F. Griffith et de Stanley Griffith, portant sur des enfants, les $\frac{2}{3}$ des cas de ganglions sains virulents répondent à cette éventualité ; dans le nôtre, portant sur des adultes, plus des $\frac{2}{3}$. Comme cette proportion des $\frac{2}{3}$ concerne déjà 65 p. 100 de tous les sujets examinés (c'est le pourcentage total d'inoculations positives de ganglions sains), on voit que par la méthode d'exploration étendue que nous avons instituée, *des bacilles de réinfection* — dus à des contaminations distinctes de celle de la primo-infection — *s'observent dans les ganglions médiastinaux sains de plus de 40 p. 100 des sujets âgés autopsiés.* Ce n'est d'ailleurs là qu'une approximation, calculée sur un nombre restreint de cas et vraisemblablement très en dessous de la réalité, mais qui n'en montre pas moins toute l'importance numérique de la chose.

Il n'y a pas lieu de s'étendre longuement sur la possibilité d'aussi fréquentes contaminations postérieurement à la primo-infection. Que l'on considère simplement qu'au sortir de l'enfance, des contaminations ont pu déjà se produire chez plus

des $3/4$ des sujets des villes ; comment, dès lors, les contaminations ne seraient-elles pas au moins aussi fréquentes à l'âge adulte, où la vie professionnelle, les déplacements, les multiples fréquentations, exposent à des contacts infectants autrement nombreux qu'au cours de l'enfance ! Il n'y a donc rien d'étonnant à ce que l'adulte héberge si souvent des bacilles de réinfection ; ce qui est curieux, par contre, c'est qu'on se soit jusqu'ici si peu intéressé à ces bacilles, dont l'existence était pourtant tellement probable *a priori*.

De nombreuses questions restent à résoudre. Comment les bacilles pénètrent-ils dans les ganglions ? Séjournent-ils auparavant quelque temps à leur point d'arrivée pulmonaire ou digestif ? Pourquoi n'y laissent-ils souvent pas trace de leur passage ? Pourquoi n'altèrent-ils pas de manière appréciable les ganglions qui les hébergent ? Autant de questions auxquelles on ne saurait encore répondre. Il faudrait, pour le faire, des conditions d'études expérimentales : or, l'étude *expérimentale* de la réinfection, telle qu'elle est habituellement réalisée — étude si intéressante à tous les égards et à laquelle restent attachés les noms de Koch, Calmette et Guérin, Römer et Joseph, Bezançon et de Serbonnes, Rist, Kindberg et Rolland, Allen Krause et Willis, Bruno Lange et Lydtin, A. Boquet — ne saurait fournir des renseignements valables pour l'homme. Car l'expérimentation part de primo-infections dont les plus bénignes, réalisées avec des bacilles de virulence habituelle, sont encore des tuberculoses mortelles ; elle réalise la réinfection au bout de quelques semaines ou de quelques mois ; et cette réinfection, survenant alors que les animaux hébergent des bacilles vivants de la primo-infection, n'est qu'une surinfection ; enfin, même l'emploi des plus petites doses de bacilles représente encore, eu égard à la sensibilité du cobaye à la tuberculose, un mode d'infection relativement sévère. Tout cela est bien différent des conditions rencontrées chez l'homme, dont la primo-infection est habituellement un épisode bénin destiné à guérir même bactériologiquement, dont les réinfections peuvent ne survenir que des années et des dizaines d'années après la primo-infection, dont la primo-infection est si souvent bactériologiquement éteinte lors de la survenue de la réfection, et dont les réinfections — comme le montrent

nos inoculations ganglionnaires — ne comportent habituellement que la pénétration de quelques rares unités bacillaires. On ne saurait donc, en cette matière, conclure de l'infection expérimentale du cobaye à l'infection naturelle de l'homme ; d'autant moins que les travaux de Allen Krause [47], de A. Boquet [6] et de Bruno Lange [49] montrent justement avec une particulière netteté, combien le comportement de la nouvelle infection varie avec la virulence des bacilles employés, les doses inoculées et le temps écoulé depuis la primo-infection. On ne peut donc émettre sur les modalités de la réinfection chez l'homme que des hypothèses, sur lesquelles nous ne nous étendrons pas ici.

Disons quelques mots sur les *su jets présentant des bacilles dans leurs ganglions sains, alors que leurs lésions tuberculeuses sont encore virulentes*. Il s'agit des 3/3 des cas étudiés par les auteurs anglais, du 1/3 des nôtres.

Lorsque ces bacilles se rencontrent dans les ganglions satellites des organes porteurs des lésions tuberculeuses, on doit admettre que ce sont les mêmes que ceux des lésions tuberculeuses. C'est d'autant plus vraisemblable que les groupes ganglionnaires en cause comportent alors souvent, à côté de ganglions sains, des ganglions macroscopiquement tuberculeux — dont les bacilles ont fort bien pu essaimer au voisinage. Mais lorsque les ganglions virulents se trouvent très à distance de l'organe tuberculeux, sans connexion lymphatique directe avec lui, l'origine des bacilles ganglionnaires reste incertaine. Il peut certes encore s'agir des bacilles des lésions tuberculeuses qui, pour arriver par exemple d'un ganglion mésentérique caséux à un ganglion médiastinal, auront successivement emprunté la voie lymphatique jusqu'à la terminaison du canal thoracique, de la voie veineuse jusqu'au cœur, la voie artérielle jusqu'au poumon, enfin la voie lymphatique, de la trame pulmonaire au ganglion médiastinal.

Mais l'hypothèse d'une nouvelle contamination est dans ces cas tout aussi défendable. Les expériences de Allen Krause et Willis, de A. Boquet, de Bruno Lange, davantage applicables à ces cas, dont la primo-infection est encore virulente, montrent que les bacilles de réinfection pénètrent fort bien, simplement avec retard, dans les ganglions satellites du lieu de réinfect-

tion. La présence de bacilles de réinfection chez des sujets encore porteurs de bacilles de la primo-infection n'est donc nullement exclue : dans les cas où les possibilités de contamination se renouvellent souvent, cette double présence est même vraisemblablement la règle.

4° Il y a enfin lieu d'envisager les conséquences des faits exposés ci-dessus sur *la compréhension des réactions tuberculiniques chez l'homme*.

A ce sujet, l'existence d'enfants *hébergeant des bacilles en l'absence de toute lésion tuberculeuse macroscopique* est d'une particulière importance. Elle pourrait, en effet, venir rejoindre l'intéressante hypothèse émise récemment par Bezançon et Braun et leurs collaborateurs [40], selon laquelle nombre d'enfants hébergeraient des bacilles tuberculeux tout en présentant des réactions tuberculiniques négatives, ces réactions ne devenant positives que très longtemps après la contamination, sous l'influence des facteurs les plus divers. Cette hypothèse de Bezançon et Braun, uniquement basée sur des faits d'ordre épidémiologique, serait démontrée de manière certaine si, chez des enfants porteurs de bacilles virulents, mais exempts de tuberculose anatomique, les réactions tuberculiniques *étaient trouvées négatives*, et si, d'autre part, le moment de la contamination pouvait être situé avec suffisamment de précision pour qu'entre ce moment et celui de l'observation de la réaction tuberculinique négative, l'écoulement d'un temps supérieur au délai habituel anté-allergique apparaisse comme certain. Malheureusement, les réactions tuberculiniques n'avaient été recherchées dans aucun des travaux rapportés, qui, tous, remontent à l'avant-guerre. Il serait de la plus haute importance que cette lacune soit comblée par de nouvelles recherches, car seule la méthode anatomo-bactériologique, portant sur des enfants minutieusement étudiés quant à leurs contacts et leurs réactions tuberculiniques, pourrait démontrer ou infirmer en toute rigueur l'hypothèse de Bezançon et Braun.

La seconde notion importante est celle de la *stérilisation des lésions tuberculeuses*. Si les lésions de la primo-infection se stérilisent, comment comprendre que les réactions tuberculiniques une fois devenues positives le restent pendant toute la vie ?

Ce fait ne peut être compris que si l'on tient compte des bacilles de réinfection. Ce sont eux qui doivent être tenus pour responsables de la positivité persistante des réactions tuberculiniques ; et comme les bacilles d'une première réinfection disparaissent également à leur tour, l'allergie toujours persistante ne peut s'expliquer que par une nouvelle infection et ainsi de suite. *C'est donc à une série d'infections tuberculeuses se relayant les unes les autres qu'il faut attribuer le caractère durable de l'allergie tuberculinique, et nullement à une seule infection qui resterait indéfiniment virulente.* D'ailleurs, le nombre d'infections tuberculeuses nécessaires à l'accomplissement de ce cycle n'est pas très élevé selon toute vraisemblance, puisque déjà dans l'enfance la stérilisation met des mois et même des années à se produire et que, ainsi que nous l'avons montré, la vitesse de la stérilisation se ralentit encore avec l'âge.

Cependant, si l'allergie tuberculinique de l'homme est bien due à la succession de plusieurs infections tuberculeuses, il doit nécessairement exister des cas avec solution de continuité entre ces différentes infections, voire même des cas avec extinction complète de l'infection, cas que le hasard aura préservés de nouvelles contaminations tuberculeuses. L'étude minutieuse des réactions tuberculiniques montre justement que de pareils cas existent, et même ils ne sont nullement exceptionnels.

Car l'allergie n'a pas chez tout le monde le caractère définitif et immuable qu'on est habitué à lui donner. Chez un même sujet, l'intensité de la réaction peut varier dans de grandes limites ; elle peut s'accroître ou s'affaiblir, voire même disparaître complètement, soit à titre temporaire — simple éclipse de l'allergie — soit à titre définitif et sans qu'il y ait à la base de ces modifications une des causes extérieures d'anergie habituellement invoquées. N'oublions pas qu'en France, Troisier, Develay et Weiss-Roudinesco ont montré, dès 1929, que chez les sujets âgés de plus de quatre-vingts ans, on trouve 11,1 p. 100 de réactions tuberculiniques négatives et 30,1 p. 100 de réactions affaiblies ou retardées, taux de réactions négatives ou affaiblies nettement supérieur à ceux de la quarantaine. En Amérique, les observations de négativation ou d'éclipse de la sensibilité tuberculinique se sont

multipliées. Citons les travaux de Austrian [3], de Mac Phedran et Opie [23], et surtout celui de Paretzky [25]. Cet auteur rapporte 80 cas de négativation (intradermo-réactions pratiquées avec des doses de tuberculine brute allant jusqu'à 10 milligrammes) ; ces 80 cas représentèrent 6 p. 100 du total des sujets allergiques examinés. 30 de ces négativations échappèrent aux examens ultérieurs, 33 se montrèrent définitives, du moins dans les limites de durée de l'expérience, enfin 17 ne furent que temporaires, allant de quelques semaines à plusieurs mois. Dans 21 cas, l'auteur put observer le cycle complet allant de la négativité initiale à la positivité et de nouveau à la négativité : cycle qui mit en moyenne un an et cinq mois à se produire. D'autre part, Paretzky rapporte que sur 71 cas, 17 montrèrent une importante décroissance à la sensibilité à la tuberculine pendant les mêmes délais.

Il est d'ailleurs possible que la réapparition de la sensibilité tuberculinique consécutive à une réinfection n'exige qu'un délai très court. Les travaux de Baldwin et Gardner [41] et surtout ceux de Willis [42] montrent, en effet, que chez des cobayes primo-infectés par la souche R1 peu virulente et devenus anergiques au bout de douze à dix-huit mois, une réinfection virulente fait réapparaître la sensibilité tuberculinique en trois à quatre jours, alors que les témoins ne deviennent allergiques qu'au 14^e jour. Il y a là comme un « souvenir » tissulaire de l'allergie qui hâterait sa réédification lors d'une réinfection même lointaine. S'il en est de même chez l'homme — ce que des recherches épidémiologiques auront à démontrer, — la durée des éclipses de l'allergie s'en trouverait raccourcie d'autant.

Tous ces faits méritent de retenir au plus haut point notre attention. Ils ont été observés sur des sujets suivis pendant un temps assez court ; une étude poursuivie plus longtemps aurait vraisemblablement multiplié ces cas d'éclipse ou de négativation de l'allergie. Et il existerait sans doute de bien plus nombreuses observations de ce genre si, dans les études systématiques des collectivités, on avait l'habitude de répéter les cuti-réactions chez les sujets trouvés antérieurement positifs. Car on ne peut évidemment prétendre observer les variations de l'allergie sans éprouver, à de nombreuses reprises, la sensi-

bilité tuberculinique d'un grand nombre de sujets déjà allergisés. La chose en vaut la peine, puisqu'on a ainsi une image au moins partielle des infections et des stérilisations successives dont la vie de presque tous les sujets est émaillée.

CONCLUSIONS

Les conclusions suivantes résultent de l'étude de la virulence de 184 lésions tuberculeuses ou fragments de tissus sains, provenant de l'autopsie de 76 adultes tuberculisés, mais indemnes de maladie tuberculeuse au sens clinique du mot, et décédés de tout autre cause que la tuberculose :

1° En raison de la forte contamination des produits étudiés par une flore microbienne secondaire, ainsi que de leur caractère paucibacillaire, l'inoculation au cobaye, complétée par la recherche périodique de la sensibilité tuberculinique, s'avère nettement plus sensible que la culture directe.

2° Dans les fragments macroscopiquement sains de foie et de rate provenant de sujets tuberculisés, on n'a jamais trouvé de bacilles tuberculeux. Les fragments de poumons, dans les mêmes conditions, n'en ont montré que très rarement.

3° Les lésions tuberculeuses, chez ces sujets dont l'infection tuberculeuse est cliniquement latente, présentent une tendance nette à la stérilisation. La stérilisation s'observe déjà pour la moitié des lésions encore caséuses ou crétaées ; elle s'observe pour plus des $4/5$ des lésions calcifiées ou ossifiées ; enfin, elle s'observe avec une fréquence sensiblement égale pour les lésions fibreuses. Une petite minorité de lésions tuberculeuses calcifiées ou fibreuses (moins de $1/5$) reste cependant virulente. Les raisons de cette persistance de virulence sont encore obscures, de même que le siège exact des bacilles encore présents (centre, périphérie ou pourtour de la lésion).

4° La stérilisation des lésions tuberculeuses est, avant tout, fonction de leur maturité histologique. Pour des lésions de maturité égale, elle s'observe avec une même fréquence quel que soit le *siège de la lésion* (poumons, autres viscères ou ganglions), quel que soit le *passé tuberculeux* du sujet (lésion de primo-infection aussi bien que lésion de réinfection), enfin quel que soit l'*âge du sujet* (enfant et adulte aussi bien que

vieillard). Cependant, comme la rapidité de cicatrisation d'une lésion tuberculeuse diminue nettement avec l'âge, les lésions des sujets âgés sont, à durée d'évolution égale, histologiquement moins avancées que celles des sujets jeunes, et par là même plus souvent virulentes.

3° L'exploration totale des ganglions trachéo-bronchiques d'adultes montre la présence de bacilles tuberculeux dans 60 p. 100 des cas, aussi bien lorsqu'il s'agit de groupes ganglionnaires macroscopiquement sains que lorsqu'il s'agit de groupes ganglionnaires présentant d'anciennes lésions calcifiées. Par là, il est démontré que ces bacilles proviennent presque toujours des ganglions macroscopiquement sains. La teneur en bacilles de tels ganglions est toujours très faible.

6° Chez des sujets hébergeant des bacilles dans leurs ganglions trachéo-bronchiques macroscopiquement sains, les cicatrices présentes dans le poumon sont le plus souvent stériles. Il résulte donc que les bacilles des ganglions proviennent de contaminations distinctes de celles qui ont produit les lésions du parenchyme pulmonaire. Au moins 40 p. 100 des adultes montrent ainsi des bacilles tuberculeux de réinfection.

7° Etant donné la stérilisation progressive des lésions tuberculeuses, on ne peut plus penser que la sensibilité tuberculinique de l'adulte soit due à la persistance de la virulence des lésions de primo-infection. Il est au contraire rationnel d'admettre que c'est à des infections tuberculeuses successives, se relayant les unes les autres, que la sensibilité tuberculinique des adultes sains doit de rester indéfiniment positive. Un intérêt grandissant s'attache dès lors aux cas, déjà signalés un peu partout dans la littérature, de diminution ou disparition totale — temporaire ou définitive — de la sensibilité tuberculinique dans la clinique humaine.

RÉSUMÉ DES OBSERVATIONS NÉCROPSIQUES ET DES RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES.

1° Les cas positifs.

OBSERVATION 19, femme soixante-douze ans.

Autopsie : Cicatrices fibreuses biapicales. Ganglions médiastinaux normaux dans leur totalité.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin normaux. Culture infectée.

Inoculation à 6 cobayes : 1 mort avant terme ; 2 morts quarante-sept et cinquante-sept jours, non tuberculeux ; 2 morts quatre-vingt-onze et cent neuf jours, 1 sacrifié cent dix-huit jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

OBSERVATION 20, homme soixante-quatre ans.

Autopsie : Cicatrice fibreuse gauche. Ganglions médiastinaux normaux dans leur totalité.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin normaux. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort vingt-sept jours avec ganglions satellites hypertrophiés et caséifiés et rate prise ; 2 morts vingt-trois et trente jours avec ganglions lombaires caséifiés et une granulation sur la rate.

OBSERVATION 22, femme soixante-quatre ans.

Autopsie : Cicatrices fibreuses biapicales. Ganglions médiastinaux normaux.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin normaux. *Culture* négative. *Inoculation* à 4 cobayes : 1 mort cinquante jours avec ganglions inguinaux, lombaires, rate et poumons pris. 3 sacrifiés soixante-douze jours avec tuberculose généralisée assez avancée.

OBSERVATION 23, homme soixante-quatre ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur droit calcifié. Cicatrices biapicales fibreuses. Indurations dans deux ganglions du groupe prétrachéo-bronchique droit.

Éléments négatifs : Cicatrice apicale droite fibreuse.

Éléments positifs : 1° Les ganglions médiastinaux indurés et calcifiés. *Culture* infectée. *Inoculation* à 2 cobayes : 2 morts quatre-vingt-deux et cent treize jours avec abcès au point d'inoculation, ganglions satellites pris, tuberculose généralisée.

2° Les ganglions du médiastin sains. *Culture* positive. *Inoculation* à 2 cobayes sacrifiés quarante-deux jours avec abcès local, hypertrophie des ganglions inguinaux et lombaires, granulations sur la rate.

OBSERVATION 25, femme cinquante et un ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation non retrouvé. Calcifications dans les ganglions prétrachéo-bronchiques gauches. Cicatrice fibreuse apicale gauche.

Éléments positifs : Les ganglions médiastinaux avec les calcifications. *Culture* infectée. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 sacrifié cent onze jours avec tuberculose généralisée.

OBSERVATION 27, homme soixante-cinq ans.

Autopsie : Plusieurs nodules calcifiés sous-apicaux droits représentant le chancre d'inoculation. 2 ganglions médiastinaux calcifiés.

Éléments positifs : 1° Le chancre d'inoculation lobaire supérieur droit. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort trente-sept jours avec ganglions satellites hypertrophiés et caséifiés, granulations sur la rate ; 1 sacrifié cent un jours avec abcès et lésions de tuberculose généralisée.

2° Les ganglions médiastinaux avec les calcifications. *Culture négative.* *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort trente-six jours sans lésion ; 1 mort quarante jours avec abcès et ganglions satellites hypertrophiés.

OBSERVATION 28, femme quatre-vingt-trois ans.

Autopsie : 4 petits nodules lenticulaires calcifiés du lobe supérieur gauche de primo-infection. Cicatrice fibreuse apicale gauche. Calcification d'un gros ganglion prétrachéo-bronchique droit.

Éléments négatifs : La cicatrice fibreuse gauche. Le ganglion calcifié correspondant aux chancres.

Éléments positifs : Ganglions médiastinaux sains (sans la calcification). *Culture infectée.* *Inoculation* à 4 cobayes : 1 sacrifié quarante-sept jours avec abcès, ganglions inguinaux et lombaires pris ; 3 sacrifiés soixante-dix jours avec tuberculose généralisée.

OBSERVATION 30, femme soixante-six ans.

Autopsie : Cicatrices scléreuses biapicales importantes avec caséifications peu étendues. Ganglions trachéo-bronchiques gros et durs avec 2 petites calcifications en l'un d'eux.

Éléments négatifs : Lésion apicale droite caséifiée.

Éléments positifs : 1° Nodule apical caséeux. *Culture négative.* *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 sacrifié quarante jours avec abcès, hypertrophie des ganglions satellites, quelques nodules sur la rate.

2° Ganglions médiastinaux avec les calcifications. *Culture négative.* *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 sacrifié quarante jours avec chancre, hypertrophie des ganglions lombaires, quelques granulations sur la rate.

OBSERVATION 32, homme vingt-cinq ans.

Autopsie : Lésion subapicale gauche encore caséreuse, de la taille d'une cerise. Chancre d'inoculation calcifié, lobaire supérieur droit. Ganglions médiastinaux normaux, sauf une calcification dans un ganglion prétrachéo-bronchique droit.

Éléments négatifs : Chancre d'inoculation droit calcifié. Ganglions médiastinaux sainsensemencés sans la calcification.

Éléments positifs : Lésion subapicale gauche caséreuse. *Culture négative.* *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort cinquante jours avec ganglions inguinaux et lombaire caséux. Rate prise.

OBSERVATION 36, femme quarante et un ans.

Autopsie : Nodule caséux apical droit. Nodule crétacé apical gauche. Ganglions médiastinaux en grande partie transformés en magma caséocalcaire.

Éléments positifs : 1° Nodule apical droit caséux. *Culture positive.* *inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 2 sacrifiés cinquante-six jours avec chancre et tuberculose généralisée.

2° Nodule apical gauche caséux. *Culture positive.* *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 2 sacrifiés cinquante-six jours avec chancre et tuberculose généralisée.

3° Ganglions médiastinaux caséeux. *Culture* négative. *Inoculation* à 2 cobayes : sacrifiés cinquante-six jours avec abcès au point d'inoculation, ganglions lombaires pris, rate avec quelques granulations.

OBSERVATION 38, homme cinquante-huit ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire inférieur droit calcifié. Calcifications dans les ganglions interbronchiques, 2 nodules calcifiés de réinfection du lobe supérieur gauche. 2 cicatrices apicales fibreuses.

Éléments négatifs : La cicatrice apicale droite fibreuse.

Éléments positifs : Les ganglions médiastinaux avec la calcification. *Culture* infectée. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 mort quarante-huit jours avec abcès local, ganglions satellites pris, foie, rate et poumons tuberculeux.

OBSERVATION 41, homme quatre-vingt-deux ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation du lobe moyen droit calcifié. Cicatrices apicales, crétacée à droite, fibreuse à gauche. Ganglions médiastinaux normaux.

Éléments négatifs : Cicatrice fibreuse gauche. Cicatrice crétacée apicale droite.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sains, sans la calcification. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 mort trente et un jours avec abcès local, ganglions satellites hypertrophiés, granulations sur foie, rate et poumons.

OBSERVATION 42, homme soixante-six ans.

Autopsie : 2 nodules calcifiés lobaires inférieurs droits et gauches avec calcification dans les ganglions interbronchiques pouvant s'interpréter tous deux comme chancre d'inoculation. 2 réinfections calcifiées dans le lobe supérieur droit et 1 dans le lobe supérieur gauche. Bride vélamenteuse droite.

Éléments positifs : 1° Bride vélamenteuse droite. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes sacrifiés soixante-dix-huit jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

2° Ganglions du médiastin sans les calcifications. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes sacrifiés soixante-dix-huit jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

OBSERVATION 44, homme cinquante-cinq ans.

Autopsie : Gros chancre d'inoculation lobaire inférieur gauche calcifié. Gros nodule apical droit crétacé. Ganglions médiastinaux petits et durs. Dans un ganglion gauche, foyer calcifié énorme.

Éléments positifs : 1° Chancre d'inoculation (parties pulmonaire et ganglionnaire étudiées ensemble). *Culture* positive. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort quatorze jours avec abcès local, ganglions inguinaux et lombaires caséifiés ; 2 sacrifiés quarante-cinq jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

2° Nodule crétacé apical droit. *Culture* positive. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 sacrifiés quarante-cinq jours, 1 mort soixante-treize jours, tous avec lésions de tuberculose généralisée très importantes.

OBSERVATION 45, homme soixante-sept ans.

Autopsie : Importantes cicatrices biapicales, la gauche fibreuse, la droite avec calcifications. Ganglions médiastinaux durs, mais non calcifiés.

Éléments négatifs : Cicatrice fibreuse gauche. Cicatrice calcifiée droite.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin non calcifiés. *Culture* positive. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort soixante et onze jours et 1 sacrifié soixante et onze jours avec abcès local, ganglions satellites pris, foie, rate et poumons tuberculeux.

OBSERVATION 47, homme soixante-dix-huit ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur gauche calcifié. Foyer correspondant dans un ganglion lobaire supérieur gauche. Nodule de réinfection calcifié du lobe supérieur droit. Cicatrices calcifiées des 2 sommets. Ganglions médiastinaux normaux.

Éléments négatifs : Cicatrice apicale calcifiée droite.

Éléments positifs : 1° Cicatrice calcifiée du sommet gauche. *Culture* négative. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 sacrifié cent jours avec légère hypertrophie ganglionnaire.

2° Ganglions médiastinaux avec la calcification. *Culture* infectée. *Inoculation* à 4 cobayes : 1 mort quatre-vingt-neuf jours avec ganglions inguinaux et lombaire caséux, rate prise ; 2 sacrifiés quatre-vingt-dix-neuf jours avec hypertrophie des ganglions inguinaux ; 1 sacrifié cent jours avec abcès local. Ganglions satellites caséux. Rares granulations sur la rate.

OBSERVATION 48, homme soixante et onze ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire inférieur gauche calcifié. Calcifications dans un ganglion lobaire homologue et dans un ganglion interbronchique gauche. 2 nodules de réinfection lobaire moyen droit et inférieur droit. Cicatrices calcifiées des deux sommets.

Éléments négatifs : Cicatrice apicale calcifiée gauche.

Éléments positifs : Les ganglions médiastinaux avec les calcifications. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes sacrifiés quarante-deux jours avec abcès au point d'inoculation. Gros ganglions inguinaux et lombaires. Petites granulations sur rate, foie et poumons.

OBSERVATION 49, femme soixante-dix-neuf ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur gauche calcifié. Calcification dans un ganglion lobaire supérieur gauche. Pas de réinfection.

Éléments négatifs : Chancre d'inoculation calcifié (partie centrale). Chancre d'inoculation (partie périphérique).

Éléments positifs : Ganglions médiastinaux sans la calcification. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 mort quarante-quatre jours avec abcès local et ganglions satellites pris.

OBSERVATION 50, homme soixante et un ans.

Autopsie : Petit nodule caséux du lobe moyen droit. 3 nodules calcifiés dans les deux autres lobes droits. Cicatrice apicale droite. Cancer

ayant envahi la totalité du poumon gauche. Ganglions sains ou néoplasiques sans trace de calcification.

Éléments négatifs : Ganglions médiastinaux sains ou néoplasiques sans calcification.

Éléments positifs : 1° Le nodule supérieur droit calcifié, vraisemblablement de réinfection. *Culture* positive. *Inoculation* à 3 cobayes sacrifiés cinquante et un jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

2° La cicatrice apicale droite fibreuse. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes sacrifiés cinquante-six jours avec chancre d'inoculation et tuberculose généralisée discrète.

OBSERVATION 51, homme soixante et un ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation calcifié du lobe inférieur gauche. Grosse calcification dans un ganglion lobaire homologue. Grosses cicatrices fibreuses biapicales. 3 réinfections calcifiées lobaires supérieures droites.

Éléments négatifs : La calcification ganglionnaire répondant au chancre.

Éléments positifs : La cicatrice fibreuse apicale droite. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort soixante jours sans lésion ; 1 mort soixante-six jours avec abcès local. Ganglions inguinaux et lombaires hypertrophiés. Granulations sur foie, rate et poumons ; 1 mort quatre-vingt-un jours sans lésions.

OBSERVATION 52, femme cinquante-cinq ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur droit calcifié. Minime calcification d'un ganglion lobaire supérieur droit. 2 petits nodules calcifiés du lobe inférieur gauche, un autre lobaire moyen. Grosses cicatrices calcifiées des deux sommets.

Éléments négatifs : Gros nodule crétaé du sommet droit. Cicatrice apicale gauche calcifiée.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sans la calcification. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 sacrifié quatre-vingt-cinq jours avec abcès local, caséification des ganglions inguinaux et lombaires. Granulations sur rate et poumons.

OBSERVATION 56, homme cinquante-quatre ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation non sûrement retrouvé. 2 nodules calcifiés du lobe moyen. Cicatrices fibreuses des deux sommets. Ganglions normaux.

Éléments négatifs : Cicatrice fibreuse gauche.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sains. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort soixante-douze jours ; 2 sacrifiés soixante-douze jours, tous avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

OBSERVATION 59, homme quarante-six ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur gauche calcifié. 3 réinfections calcifiées du lobe supérieur droit. 2 grosses cicatrices apicales calcifiées. Calcifications dans les ganglions lobaires supérieurs gauches et lobaires inférieurs droits.

Éléments positifs : 1° Les deux cicatrices calcifiées des deux sommets réunis. *Culture négative*. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort trente-trois jours sans lésions ; 1 mort trente-huit jours avec abcès local. Ganglions inguinaux et lombaires caséifiés, une granulation sur la rate ; 1 mort quarante-six jours avec abcès local. Ganglions inguinaux et lombaires caséifiés.

2° Les ganglions médiastinaux avec les calcifications. *Culture positive*. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort quarante-deux jours avec abcès. Ganglions satellites hypertrophiés et caséux, rares granulations sur la rate ; 1 sacrifié soixante jours sans lésion ; 1 sacrifié soixante jours avec abcès local, ganglions inguinaux et lombaires pris, rares granulations sur la rate et les poumons.

OBSERVATION 60, femme cinquante-neuf ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation non retrouvé. 6 réinfections calcifiées disséminées dans les lobes supérieur et moyen droits et supérieur gauche. Rien aux sommets. Ganglions normaux.

Éléments négatifs : 3 nodules de réinfection calcifiés.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sains. *Culture négative*. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 mort quarante-quatre jours avec abcès local et ganglions satellites pris.

OBSERVATION 61, homme soixante-cinq ans.

Autopsie : Multiples calcifications du lobe inférieur gauche pouvant être des chancres. Cicatrices calcifiées apicales gauches. Multiples calcifications ganglionnaires ; en certains groupes, caséifications récentes étendues.

Éléments négatifs : Chancre d'inoculation calcifié lobaire inférieur gauche. Cicatrice apicale gauche calcifiée.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin calcifiés et caséux. *Culture négative*. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort trente et un jours avec abcès local ; 1 mort quarante-cinq jours avec abcès local, ganglions satellites pris et granulations sur la rate ; 1 mort quarante-huit jours avec ganglions poplités et inguinaux pris ; une granulation sur la rate.

OBSERVATION 62, homme soixante-dix-neuf ans.

Autopsie : 2 chancres d'inoculation lobaires supérieurs droits et 2 chancres lobaires supérieurs gauches calcifiés ; 4 nodules calcifiés de réinfection des lobes moyen droit et inférieur droit ; 2 cicatrices calcifiées apicales. Calcification dans les ganglions lobaires supérieurs droits et paratrachéaux gauches.

Éléments positifs : 1° 4 nodules calcifiés de réinfection pris ensemble dont 1 apical. *Culture positive*. *Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme, 1 mort soixante-six jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

2° Ganglions du médiastin avec les calcifications. *Culture positive*. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort trente-huit jours sans lésion ; 1 sacrifié soixante et un jours avec énorme tuberculose à point de départ inguinal.

OBSERVATION 64, femme soixante-seize ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation calcifié du lobe supérieur droit. Calcifications dans les ganglions lobaires supérieurs homologues et dans les prétrachéo-bronchiques droits ; 2 nodules crétaqués des lobes supérieurs droits et inférieurs gauches. Pas de cicatrice apicale.

Éléments négatifs : Le chancre d'inoculation calcifié. Les deux nodules crétaqués de réinfection.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin avec les calcifications. *Culture infectée. Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort quarante-neuf jours avec abcès local et tuberculose généralisée assez discrète ; 1 sacrifié cinquante jours avec abcès localisé et ganglions satellites pris ; 1 sacrifié cinquante jours avec tuberculose généralisée.

OBSERVATION 65, femme cinquante-neuf ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation non retrouvé ; 9 petits nodules calcifiés de réinfection disséminés dans tous les lobes. Cicatrice apicale droite. Ganglions absolument normaux.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sains. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort dix-neuf jours avec abcès local et hypertrophie des ganglions satellites ; 1 mort trente-cinq jours avec abcès local. Ganglions satellites pris et quelques granulations sur la rate ; 1 mort trente-neuf jours avec hypertrophie des ganglions satellites. *Culture* négative.

OBSERVATION 69, homme soixante-sept ans.

Autopsie : Aucun élément permettant d'affirmer sûrement la tuberculose.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sains. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort quarante-huit jours et 2 sacrifiés cinquante et un jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

OBSERVATION 70, homme soixante et onze ans.

Autopsie : Plusieurs nodules calcifiés de primo-infection dans le lobe supérieur gauche. Calcifications dans les ganglions homologues. Réinfections calcifiées du lobe supérieur droit.

Éléments négatifs : Les nodules calcifiés de réinfection.

Éléments positifs : Les ganglions du médiastin avec les calcifications. *Culture infectée. Inoculation* à 3 cobayes : 2 morts avant terme ; 1 mort soixante-douze jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

OBSERVATION 71, femme soixante-huit ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation calcifié du lobe moyen droit. 2 réinfections calcifiées du lobe inférieur et du lobe supérieur gauches. Cicatrice apicale gauche. Calcifications ganglionnaires lobaires supérieures droites et prétrachéo-bronchiques droites. Petite tuberculose récente du lobe supérieur gauche.

Éléments positifs : 1° Cicatrices de réinfection calcifiées. *Culture* négative. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 2 sacrifiés quarante-trois jours avec tuberculose généralisée à point de départ inguinal.

2° Ganglions du médiastin avec les calcifications. *Culture négative.* *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 2 sacrifiés cinquante-huit jours avec chancre d'inoculation, ganglions satellites hypertrophiés, foie et rate pris.

OBSERVATION 72, femme quatre-vingt-trois ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire inférieur droit calcifié. Calcifications dans un ganglion lobaire inférieur droit homologue. Calcifications dans un ganglion lobaire inférieur gauche, répondant vraisemblablement à un premier chancre d'inoculation lobaire supérieur gauche résorbé.

Éléments négatifs : Calcification ganglionnaire lobaire inférieur droit répondant au chancre. Poumon sain. Ganglions médiastinaux sains avec la calcification lobaire inférieure gauche.

Éléments positifs : Chancre d'inoculation lobaire inférieur droit calcifié. *Culture négative.* *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 2 sacrifiés soixante et un jours avec ganglions satellites pris. Granulations sur la rate.

OBSERVATION 73, femme soixante-treize ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation non sûrement retrouvé. Belle cicatrice apicale calcifiée droite. Ganglions médiastinaux normaux.

Éléments négatifs : Cicatrice calcifiée apicale gauche.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin sains. *Culture positive.* *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort trente et un jours sans lésion ; 1 mort soixante-deux jours avec abcès local, ganglions inguinaux et lombaires hypertrophiés et caséux.

OBSERVATION 75, homme cinquante ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation calcifié lobaire supérieur gauche avec calcification presque totale d'un ganglion lobaire supérieur gauche homologue. 2 réinfections calcifiées, lobaire supérieure droite et lobaire inférieure gauche. Cicatrice apicale fibreuse gauche.

Éléments positifs : 1° Calcification ganglionnaire du chancre d'inoculation. *Culture négative.* *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme. 1 sacrifié trente-huit jours avec ganglions satellites hypertrophiés et caséux, rate prise.

2° Ganglions du médiastin sains sans la calcification. *Culture négative.* *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort quarante-deux jours et 1 mort cinquante-quatre jours avec abcès local et ganglions satellites caséux.

OBSERVATION 76, femme quarante-six ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur gauche calcifié. Réinfection lobaire supérieure droite calcifiée. Petites lésions de tuberculose récente au sommet droit, coexistant avec une métastase de cancer.

Éléments négatifs : Chancre d'inoculation lobaire supérieur gauche calcifié.

Éléments positifs : Ganglions du médiastin cancéreux avec les calci-

fications. *Culture* positive. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort trente-deux jours sans lésion ; 2 sacrifiés cinquante-trois jours avec chancre d'inoculation, ganglions satellites hypertrophiés et caséux. Foie, rate et poumons pris.

OBSERVATION 78, homme cinquante-cinq ans.

Autopsie : Absence totale de la moindre cicatrice tuberculeuse des poumons ou des ganglions.

Éléments négatifs : poumon sain.

Éléments positifs : Les ganglions sains du médiastin. *Inoculation* à 3 cobayes : 1 mort dix-huit jours avec abcès caséux, ganglions satellites hypertrophiés ; 1 mort soixante-quatorze jours sans lésion ; 1 mort quatre-vingt-un jours avec abcès caséifié et ganglion lombaire hypertrophié et caséux.

OBSERVATION 80, homme soixante-cinq ans.

Autopsie : Calcification ganglionnaire lobaire inférieure gauche. Cicatrice fibreuse du sommet gauche.

Éléments positifs : Les ganglions sains du médiastin sans la calcification. *Culture* positive. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort trente jours sans lésion ; 1 mort quarante jours avec abcès local, ganglions caséux et une granulation sur la rate.

OBSERVATION 83, homme soixante-sept ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation non retrouvé. Réinfection lobaire supérieure gauche ancienne. 2 nodules de réinfection plus récents créta-cés dans les lobes supérieur droit et inférieur gauche. Réinfection toute récente encore caséuse du lobe supérieur droit. Ganglions tous normaux.

Éléments positifs : 1° Réinfection lobaire supérieure gauche calcifiée. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort trente-trois jours avec ganglions inguinaux et lombaires hypertrophiés et caséux.

2° Réinfection lobaire supérieure droite caséuse. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort vingt-huit jours avec abcès, ganglions satellites hypertrophiés et caséifiés, rate prise.

OBSERVATION 84, homme soixante-quinze ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire supérieur droit. Réinfection fibro-calcaire du lobe supérieur gauche. Calcification dans les ganglions lobaires supérieurs et inférieurs droits.

Éléments négatifs : Ganglion calcifié du lobe supérieur droit, répondant au chancre.

Éléments positifs : Les ganglions sains du médiastin sans les calcifications. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort seize jours avec abcès local et hypertrophie des ganglions inguinaux ; 1 mort dix-sept jours avec hypertrophie des ganglions inguinaux et lombaires.

OBSERVATION 85, femme quarante-quatre ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire inférieur droit calcifié. Dans

deux ganglions prétrachéo-bronchiques droits, petits nodules tuberculeux crétacés. Cicatrice apicale fibreuse du sommet gauche.

Eléments négatifs : Le chancre d'inoculation calcifié. Les 2 ganglions contenant les lésions crétacées. Poumon sain.

Eléments positifs : Cicatrice apicale fibreuse du sommet gauche. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 sacrifié quatre-vingt-dix-sept jours avec abcès local, adénite des ganglions inguinaux et lombaires, quelques granulations sur la rate et les poumons.

OBSERVATION 87, homme cinquante-six ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation lobaire moyen droit. Calcification dans plusieurs ganglions trachéo-bronchiques et interbronchiques droits. Réinfection calcifiée lobaire supérieure gauche.

Eléments négatifs : Réinfection calcifiée lobaire supérieure gauche. Poumon, foie et rate sains.

Eléments positifs : Ganglions du médiastin sans les ganglions calcifiés. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort quarante et un jours avec abcès local et ganglions lombaires pris.

OBSERVATION 89, femme trente-huit ans.

Autopsie : 5 à 6 nodules caséux lobaires supérieurs droits avec caséification ganglionnaire homologue (primo-infection récente). Les autres ganglions médiastinaux sont normaux.

Eléments négatifs : Poumons, foie et rate sains.

Eléments positifs : 1° Nodules caséux lobaires supérieurs droits. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort trente-trois jours sans lésion ; 1 sacrifié quatre-vingt-douze jours avec chancre d'inoculation, gros ganglions lombaires et inguinaux, granulations sur rate et poumons.

2° Ganglions sains du médiastin sans la calcification. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort quarante-trois jours avec ganglions inguinaux et lombaires caséifiés. Granulations sur foie, rate et poumons.

OBSERVATION 90, homme cinquante-sept ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation calcifié lobaire supérieur droit. Calcification dans un ganglion lobaire homologue. Réinfections calcifiées anciennes et récentes supérieures gauches. Cicatrice apicale fibreuse droite.

Eléments négatifs : La réinfection calcifiée lobaire moyenne droite. Les ganglions médiastinaux avec la calcification.

Eléments positifs : 1° Le chancre d'inoculation calcifié. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort seize jours avec abcès local et ganglions hypertrophiés ; 1 sacrifié quatre-vingt-dix-huit jours avec tuberculose généralisée avancée.

2° La cicatrice fibreuse apicale droite. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort quarante jours avec abcès local, ganglion caséux, une granulation sur la rate.

OBSERVATION 91, femme cinquante-cinq ans.

Autopsie : Minime calcification du lobe moyen.

Éléments négatifs : La calcification (réinfection vraisemblable). Poumon sain.

Éléments positifs : Ganglions sains du médiastin. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort cinquante-sept jours avec ganglions inguinaux et lombaires pris ; 1 mort quatre-vingt-treize jours avec abcès local, énormes ganglions inguinaux et lombaires, tuberculose généralisée.

OBSERVATION 92, femme trente ans.

Autopsie : Nodule calcifié lenticulaire du lobe supérieur gauche. Cicatrice apicale fibreuse droite.

Éléments positifs : 1^{re} Cicatrice fibreuse de l'apex droit. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort neuf jours avec abcès local et ganglions satellites hypertrophiés ; 1 mort vingt-six jours avec abcès local, ganglions satellites pris, granulations sur la rate.

2^e Poumon sain. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort soixante-treize jours avec ganglions pris et tuberculose généralisée avancée.

3^e Ganglions sains du médiastin. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort cinquante-quatre jours avec chancre d'inoculation, ganglions inguinaux et lombaires caséifiés, tuberculose généralisée.

OBSERVATION 93, homme quatre-vingt-un ans.

Autopsie : 27 nodules calcifiés disséminés dans tous les lobes. Calcifications dans tous les groupes ganglionnaires : mais quelques ganglions en sont totalement exempts.

Éléments négatifs : Les animaux inoculés avec les nodules pulmonaires et les ganglions calcifiés sont tous morts avant terme. Poumons, foie et rate sains.

Éléments positifs : Les ganglions médiastinaux sains. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort avant terme ; 1 mort quarante et un jours avec abcès local, hypertrophie des ganglions inguinaux et lombaires.

OBSERVATION 95, homme soixante-dix-huit ans.

Autopsie : Chancre d'inoculation fibreux du lobe inférieur droit. Calcification dans un ganglion lobaire homologue. Importantes cicatrices apicales fibreuses des 2 sommets. Réinfection calcifiée du lobe supérieur gauche. Ganglions médiastinaux sains.

Éléments négatifs : Cicatrice fibreuse apicale gauche. Ganglions lobaires inférieurs droits calcifiés répondant au chancre. Poumons, foie et rate sains.

Éléments positifs : Les ganglions médiastinaux sains sans le ganglion calcifié. *Inoculation* à 2 cobayes : 1 mort vingt-trois jours avec abcès au point d'inoculation et ganglions satellites pris ; 1 mort trente-deux jours avec abcès local, ganglions inguinaux caséifiés et ganglions lombaires hypertrophiés.

2° Les cas négatifs.

NUMEROS	SEXE ET AGE	LÉSIONS TUBERCULEUSES ET TISSUS SAINS non bacillifères
8	M., 62.	Grosse cicatrice fibreuse du sommet gauche.
9	F., 74.	Cicatrice apicale gauche fortement indurée.
10	M., 77.	Cicatrice fibreuse peu indurée du sommet droit. Cicatrice identique du sommet gauche.
12	F., 80.	Nodule de réinfection calcifié du lobe supérieur gauche.
14	F., 79.	Cicatrice fibreuse du sommet gauche.
15	F., 73.	Cicatrice étoilée de l'extrême sommet droit.
16	F., 65.	Cicatrice fibreuse de l'apex gauche avec bride en regard Nodule de réinfection calcifié lobaire supérieur gauche.
18	F., 63.	Cicatrice fibreuse apicale droite.
24	M., 36.	Ganglions du médiastin dont l'un est calcifié.
26	M., 32.	Chancre d'inoculation calcifié du lobe supérieur droit. Ganglions du médiastin avec zones crélatées.
29	F., 81.	Cicatrice fibreuse étendue du sommet gauche. Cicatrice moindre du sommet droit. Ganglions calcifiés du médiastin.
31	M., 72.	Nodule de réinfection lobaire inférieur droit. Ganglions sains du médiastin.
33	M., 64.	Cicatrice fibreuse du sommet gauche. Cicatrice fibreuse importante du sommet droit. Ganglions du médiastin, dont l'un est calcifié.
35	F., 32.	Cicatrice fibreuse du sommet gauche. Cicatrice fibreuse du sommet droit. Ganglions sains du médiastin.
37	F., 52.	Cicatrice étoilée du sommet droit. Cicatrice fibreuse identique du sommet gauche. Ganglions sains du médiastin.
39	F., 59.	Cicatrice très indurée du sommet droit. Cicatrice identique du sommet gauche. Ganglions du médiastin, dont deux calcifiés.
40	M., 55.	Cicatrice fibreuse importante du sommet gauche. Ganglions sains du médiastin.
43	M., 59.	Cicatrice peu importante fibreuse du sommet droit. Ganglions du médiastin avec deux calcifications.
53	M., 52.	Ganglions du médiastin, dont l'un avec calcification.
57	F., 87.	Cicatrice calcifiée du sommet droit. Ganglions du médiastin avec calcification.
58	M., 52.	Ganglions sains du médiastin.
68	F., 57.	Chancre d'inoculation calcifié du lobe inférieur gauche.
77	M., 58.	Poumon sain. Chancre d'inoculation calcifié (partie ganglionnaire). Ganglions sains du médiastin.
79	F., 35.	Ganglions sains du médiastin, un ganglion calcifié étant enlevé. Poumon sain.
81	M., 85.	Chancre d'inoculation calcifié (partie ganglionnaire). Cicatrice fibreuse du sommet gauche. Ganglions sains du médiastin, un ganglion calcifié étant enlevé.
82	F., 48.	Chancre d'inoculation calcifié lobaire supérieur gauche. Ganglions sains du médiastin, un ganglion calcifié étant enlevé. Rate saine. Foie sain.
86	M., 70.	Caverne apicale droite pas sûrement tuberculeuse (kyste?). Ganglions médiastinaux sains. Poumon sain. Foie sain. Rate saine.
88	M., 30.	Réinfection calcifiée du lobe inférieur gauche. Réinfection ossifiée du même lobe. Ganglions sains du médiastin. Poumon sain.
94	M., 91.	Poumon sain. Ganglions sains du médiastin, un ganglion caséux étant enlevé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMEUILLE, SAENZ et CANETTI. *Bull. et Mém. Soc. Médic. des Hôp. de Paris*, 8 avril 1938.
- [2] ANDERS. *Beit. Klin. Tuberk.*, **81**, 1932, p. 260.
- [3] AUSTRIAN. *Americ. Rev. Tuberc.*, **16**, 1927, p. 501.
- [4] BESSIN. *Virchows Archiv*, **280**, 1931, p. 837.
- [5] BÖHNE. *Beitr. Klin. Tuberk.*, **75**, 1930, p. 164.
- [6] BOQUET (A.). *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 5.
- [7] CANETTI (G.). Les réinfections tuberculeuses latentes du poumon. *Thèse Paris*, 1939.
- [8] DEJERINE. *C. R. Soc. de Biol.*, **4**, 1884, p. 500.
- [9] EASTWOOD et GRIFFITH (F.). *Reports to the Local Govern. Board. New Series*, **88**, 1914, p. 1.
- [10] FELDMAN et BAGGENSTOSS. *Amer. Journ. of Path.*, **32**, 1938, p. 473.
- [11] GAFFKY. *Tuberc.*, **6**, 1907, p. 437.
- [12] GRIFFITH (Stanley). *Reports to the Local Govern. Board. New Series*, **88**, 1914, p. 105.
- [13] GRIFFITH (Stanley). *Journ. of Path. and Bact.*, **32**, 1929, p. 813.
- [14] HARBITZ. *Untersuchungen über die Häufigkeit. der Tuberk. Christiana*, 1905.
- [15] KAEBLE. *Münch. Med. Wochens.*, **4**, 1899, p. 622.
- [16] KOENIGSFELD et PUHL. *Zeit. f. exper. Med.*, **35**, 1923, p. 231 et 259.
- [17] KRAUSE (Allen) et WILLIS. *Journ. Immun.*, **9**, 1924, p. 231 et 259.
- [18] KURLOW. *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, **44**, 1889, p. 100.
- [19] LANGE et LYDTIN. *Zeitsch. f. Hyg.*, **110**, 1929, p. 209.
- [20] LOOMIS. *Journ. of Amer. Assoc.*, **16**, 1891, p. 98.
- [21] RABINOWITSCH (Lydia). *Zeitsch. f. Tuberk.*, **15**, 1910, p. 215.
- [22] MAC FADYEAN et MAC CONKEY. *Beit. Med. Journ.*, 1903, p. 129.
- [23] MAC PHEDRAN et OPIE. *Am. Journ. of Hyg.*, **22**, 1935, p. 644.
- [24] OPIE et ARONSON. *Arch. of Path. and Labor. Med.*, **4**, 1927, p. 1.
- [25] PARETZKY. *Amer. Rev.*, **33**, 1936, p. 370.
- [26] PERRAULT. La dispersion bacillaire. *Thèse Paris*, 1934.
- [27] PIZZINI. *Zeitsch. f. Klin. Med.*, **21**, 1892, p. 329.
- [28] RUBINSTEIN et TRIUSS. *Spitzenprozesse Tuberkulose-Bibliothek*, n° 56, 1934, S. Barth, Leipzig.
- [29] SAENZ et CANETTI. *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 829.
- [30] SAENZ, COSTE et COSTIL. *C. R. Soc. de Biol.*, **121**, 1936, p. 1141.
- [31] SAENZ et COSTIL. Diagnostic bactériologique de la tuberculose. *Mono-graphie de l'Institut Pasteur*, 1936, Masson, édit.
- [32] SCHMITZ. *Frank. Zeitsch. f. Path.*, **3**, 1909, p. 88.
- [33] SCHRADER. *Virchows Archiv*, **269**, 1928, p. 356.
- [34] TROISIER, DEVELAY et WEISS-ROUDINESCO. *La Presse Médicale*, 30 janvier 1929.
- [35] UNGERMANN. *Tub. Arbeit. a. d. Kais. Gesund. Amt.*, **12**, 1912, p. 109.

- [36] WANG. *Lancet*, **2**, 1916, p. 417.
- [37] WEBER. *Deutsch. med. Woch.*, **2**, 1906, p. 1980.
- [38] WEBER et BAGINSKY. *Tub. Arbeit. a. d. Kais. Gesund. Amt.*, **7**, 1907, p. 102.
- [39] WEICHSELBAUM et BARTEL. *Wien. Klin. Woch.*, **18**, 1905, p. 241.
- [40] BEZANÇON, BRAUN, FREY, RAGU et DE PAUL. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, **118**, 1937, p. 64.
- [41] BALDWIN et GARDNER. *Americ. Rev. Tuberc.*, **5**, 1921, p. 429.
- [42] WILLIS H. S. *Americ. Rev. Tuberc.*, **17**, 1923, p. 240.

ÉTUDE SUR LA VARIABILITÉ DE *B. ANTHRACIS* A PARTIR DE GERMES ISOLÉS AU MICROMANIPULATEUR

par Yoshio TAKAHASHI.

(Institut Pasteur, Service de M. A. BOQUET.)

Le phénomène de la dissociation n'apparaît sous son vrai jour que si l'on emploie des techniques permettant d'obtenir des colonies à partir de germes séparés. Chacun sait qu'une colonie microbienne n'est autre chose qu'une population d'éléments souvent génétiquement hétérogènes, cause d'erreur importante, malheureusement trop négligée, qui trouble les résultats obtenus par divers expérimentateurs et rend leurs opinions discordantes sur la variation chez les bactéries. F. Chodat (1926) avait déjà signalé que tous les travaux relatifs à la variation qui ne sont pas fondés sur l'observation directe du développement d'un germe unique, doivent être considérés comme sans valeur.

Pour compléter nos connaissances sur la variabilité de *B. anthracis* en rapport avec la dissociation à partir d'un seul germe, nous avons entrepris une série de recherches expérimentales *in vitro* et *in vivo*, en utilisant des bactériidies charbonneuses, isolées au moyen de la méthode de Nakamura.

I. — Matériaux expérimentaux et techniques employés.

a) SOUCHES ET MILIEUX. — Nous avons employé trois souches de bactériidies, deux souches de laboratoire (Humaine et Sclavo) et la souche 340, récemment isolée du cadavre d'un cheval charbonneux.

Pour étudier la dissociation *in vitro*, nous avons laissé vieillir, à la température du laboratoire ou à l'étuve, les cultures sur gélose ou en bouillon ordinaire, transplantées directement à partir de colonies unicellulaires. Nous avons

également étudié la dissociation *in vivo* par inoculation sous-cutanée ou intraveineuse au cobaye et à la souris, de cultures unicellulaires en bouillon à 37°, âgées de vingt à vingt-quatre heures. La différenciation des colonies a été effectuée d'après les caractères des cultures sur sérum de cheval coagulé à 75°, en position inclinée, pendant une heure. C'est, en général, par ensemencement direct sur ce milieu de vieilles cultures du sang du cœur ou de liquide d'œdème que nous avons obtenu deux types de colonies : des colonies S lisses, rondes ou ovales, bombées, luisantes et à bords réguliers, et des colonies R rugueuses, mates, sèches, plates et à bords irréguliers. A l'examen microscopique, les colonies S apparaissent composées de bacilles entourés de substance capsulaire, colorable en rose violet par le bleu de méthylène de Löffler, tandis que les colonies R ne contiennent pas d'éléments encapsulés ou n'en contiennent que très peu. Sur gélose ordinaire, les colonies des deux types ne présentent pas de grandes différences : elles se développent de la même manière sous l'aspect givré et rugueux (tête de Méduse).

b) MÉTHODE D'ISOLEMENT DE NAKAMURA. — Parmi les techniques micrurgiques (isolement, dissection, injection, etc.), celle de Nakamura permet non seulement d'obtenir avec facilité, sécurité et rapidité, une grande série de germes séparés, mais encore, si on est en possession d'une table chauffante à 37°, elle offre le moyen de suivre, sans interruption et sans beaucoup de peine, le développement et l'évolution des microbes.

Le principe de cette méthode consiste à isoler au micromanipulateur, au moyen d'une micropipette, un germe unique contenu dans une couche mince de milieu transparent quelconque, étalé sur une lamelle. Cette méthode peut être employée avec tous les micromanipulateurs.

On trempe deux ou trois fois une grande lamelle de verre, très propre et stérile (24 millimètres × 24 millimètres ou 24 millimètres × 32 millimètres), dans de la gélose maintenue à l'état liquide à 60-65°, de façon qu'une couche très mince et homogène se forme à la surface de la lamelle. Lorsqu'elle est complètement refroidie, on découpe, aussi vite que possible, la couche de gélose, avec une petite spatule stérile, en laissant au milieu de la lamelle un disque de gélose de 12-15 milli-

mètres carrés et en éliminant en même temps les parties extérieures inutiles. Cela fait, on dépose la lamelle sur les cales de la chambre humide, le disque de gélose à l'intérieur. Puis on marque, avec un marqueur, plusieurs petits cercles sur la surface extérieure de la lamelle. C'est dans ces petits cercles que nous isolerons des germes séparés. Toujours sous le contrôle du microscope, on touche légèrement la surface de la gélose avec la micropipette remplie de suspension bactérienne à la concentration convenable. Dès que la pointe de la pipette atteint la couche de gélose, on en voit sortir des germes isolément. On note alors les cercles où un seul germe s'est déposé. Cette opération terminée, on transporte la lamelle sur une lamelle creuse, stérile, et, après l'avoir solidement fixée avec un mélange de vaseline et de paraffine en parties égales, on la porte à l'étuve. Les germes se développent, on obtient, dès le lendemain, des colonies visibles à l'œil nu.

Tous les ustensiles qu'on utilise pour l'isolement doivent être strictement stériles.

On évite toutes chances de souillure par des germes de l'air en opérant le plus rapidement possible, surtout lors de l'étalement et du découpage de la couche de gélose. Nous employons cette méthode depuis deux ans et demi ; jusqu'à présent, nous n'avons pas eu de contaminations.

Le nombre des petits cercles qu'on peut marquer sur une lamelle ne dépasse pas 16. Si on confectionne parfaitement la micropipette et que l'on dispose d'une suspension bactérienne à la concentration convenable, on peut isoler au moins 40 germes séparés, différents, par lamelle. Les manipulations ne durent pas plus de trente minutes pour un opérateur habitué.

Pour introduire la suspension microbienne dans la pipette, on en porte sur une lamelle une gouttelette, dont on met au point un des bords, juste au milieu du microscope. Puis on monte doucement la micropipette, après en avoir placé la pointe juste au milieu du champ du microscope. Dès que la pointe touche la gouttelette, la suspension pénètre, par capillarité, dans la micropipette.

Nous n'avons employé à cette fin que des cultures en bouillon à 37°, âgées de trois ou quatre heures.

MICROPIPETTES. — La confection des micropipettes constitue une partie importante de la technique d'isolement d'un germe unique. Nous ne saurions trop recommander, pour cette opé-

ration, le microforge de P. de Fonbrune (1), mais à défaut, on s'habitue aisément à les préparer en opérant comme il suit :

A partir de tubes de verre fabriqués spécialement pour cet usage, on fait, à la flamme, des pipettes mères de 0 cent. 5-0 cent. 7 de diamètre et de 15-20 centimètres de longueur. Pour obtenir une bonne pipette, l'opérateur doit être bien placé en face de la microflamme, la poitrine et les coudes appuyés contre la table, de façon que le menton se trouve presque au niveau de la microflamme. On saisit une pipette-mère en deux points de son extrémité droite, l'un avec le pouce et l'index de la main gauche et l'autre avec une petite pince tenue dans la main droite. La distance entre les deux points ne doit pas dépasser 2 centimètres, pour qu'on puisse immobiliser solidement la pipette. On transporte doucement la pipette au-dessus de la microflamme — jamais dans la flamme — de façon qu'elle soit chauffée à égale distance des deux points saisis par la main gauche et par la pince. Au moment où la pipette est suffisamment amollie, on l'étire avec la pince, en la sortant en même temps de l'autre côté de la microflamme, sans y appliquer trop de force, jusqu'à ce qu'elle se coupe automatiquement. Si la micropipette est bien faite, on entend, au moment où elle se coupe, un claquement léger et fin. On l'examine ensuite au microscope. Une bonne micropipette doit avoir un orifice complètement rond, coupé perpendiculairement à l'axe longitudinal de la pipette-mère. La micropipette une fois confectionnée, on la coude verticalement sur la microflamme, à environ 3 millimètres de l'extrémité, à l'aide de la pointe d'une autre pipette-mère.

II. — Expériences sur la dissociation.

a) SOUCHE HUMAINE.

Cette souche est gardée depuis longtemps au laboratoire. Elle présente les caractères morphologiques et cultureux typiques de *B. anthracis*. Sur gélose ordinaire : culture abondante, givrée, dont les colonies séparées présentent l'aspect dit en tête de Méduse. Sporulation remarquable et Gram positif.

Pour notre expérience, nous nous sommes servi d'une culture du type S, c'est-à-dire d'une culture qui donne naissance, sur sérum coagulé de cheval, à des colonies S. A l'examen microscopique, tous les bacilles en chaînes des

(1) DE FONBRUNE (P.). *Micromanipulateur pneumatique et microforge pour la fabrication des microinstruments*. Société industrielle d'Imprim., Paris, 1937.

colonies S apparaissent entourés d'une substance capsulaire, teintée en rose violet par le bleu de méthylène de Löffler, tandis que les corps bacillaires sont colorés en bleu.

A partir de la culture du type S, nous avons d'abord isolé quatre cultures unicellulaires (Humaine S I, II, III et IV) au moyen de la méthode d'isolement que nous venons de décrire. Ces subcultures ont les mêmes caractères morphologiques et biologiques que la souche-mère, sauf les propriétés

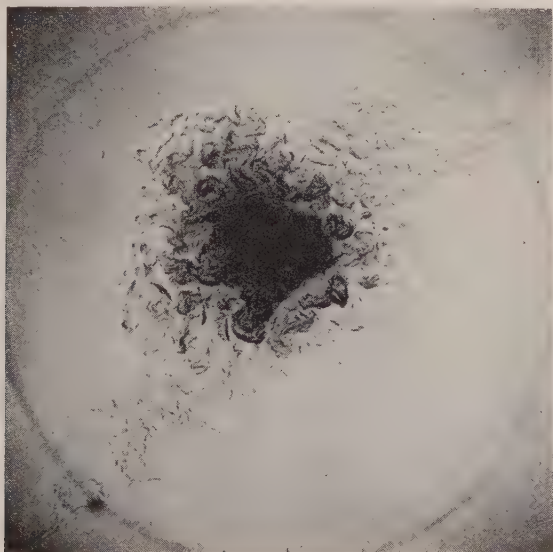


FIG. 1. — Colonie unicellulaire de la variante S de la souche Humaine sur gélose ordinaire âgée de vingt-quatre heures à 37°. On voit l'ombre du cercle marqué sur la lamelle. 120X.

sporogènes qui varient selon les cultures. Elles tuent le cobaye, comme la souche-mère, aux doses de 0 c. c. 001-0 c. c. 000.1 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures.

DISSOCIATION *in vitro*. — Nous avonsensemencé, immédiatement après l'isolement, les quatre cultures unicellulaires, en même temps que la souche-mère, sur gélose ordinaire et en bouillon ordinaire et nous avons laissé vieillir les cultures pendant plus d'un mois, à l'étuve ou à la température du labo-

ratoire. Par ensemencement direct sur sérum coagulé de ces vieilles cultures, nous avons obtenu, à côté de colonies lisses identiques à celles des souches d'origine, d'autres colonies d'un aspect différent, dont la morphologie a été déjà décrite par W. Schaefer (2) et nous-même (3). Ce sont des colonies d'aspect rugueux, mates, sèches et plates, légèrement ondulées en surface, avec des bords irréguliers et des dimensions



FIG. 2. — Colonie unicellulaire de la variante R de la souche Humaine sur gélose ordinaire âgée de vingt-quatre heures à 37°. 420 X.

un peu plus petites que celles des colonies S. Ces colonies ont plutôt tendance à s'étendre sur le milieu. Microscopiquement, elles ne contiennent que des bacilles dépourvus de substance capsulaire ou presque. Si l'encapsulation a lieu, elle est moins nette que celle des bacilles des colonies lisses : ce sont deux ou trois éléments d'un long filament bacillaire ou un court filament entier qui sont entourés de substance capsulaire. Les éléments encapsulés sont très rares ; on en voit peu

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, **422**, 1936, p. 1178.

(3) *C. R. Soc. de Biol.*, **427**, 1938, p. 399.

parmi les nombreux filaments qui se colorent uniquement en bleu.

DISSOCIATION *in vivo*. — Nous avons inoculé les cultures unicellulaires au cobaye ou à la souris, immédiatement après l'isolement, et nous avonsensemencé directement sur sérum coagulé du liquide d'œdème ou du sang du cœur des animaux

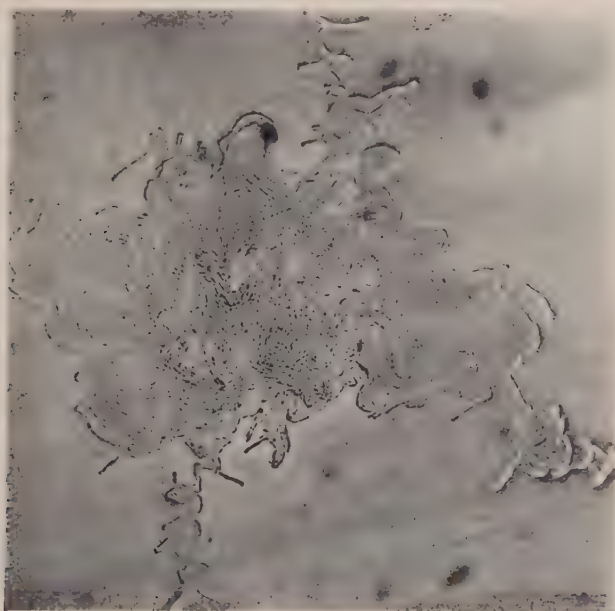


FIG. 3. — Colonie unicellulaire de la variante S de la souche Humaine sur gélose ordinaire âgée de vingt heures à 37°. 400 X.

morts. Des variantes R ont été ainsi obtenues. C'est le liquide d'œdème qui a fourni le plus fréquemment et avec le plus d'abondance des colonies de ce type. Le sang du cœur, au contraire, ne nous en a donné que très rarement.

Une fois obtenues à l'état pur, par repiquages répétés sur sérum coagulé, à partir de colonies isolées *in vitro* ou *in vivo*, toutes les cultures ont conservé dans la suite les mêmes caractères

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DES COLONIES S ET R. — Sur

gélose ordinaire, les cultures S et R ne présentent pas de grandes différences ; elles donnent toutes deux une culture abondante, d'aspect givré. On remarque cependant, pour la culture R âgée de trois à cinq jours, une tendance à s'étaler sur le milieu, tandis que les bords des cultures S restent bien nets. En bouillon ordinaire, les deux cultures se développent de la même manière ; elles ne troublent pas ce milieu et forment,

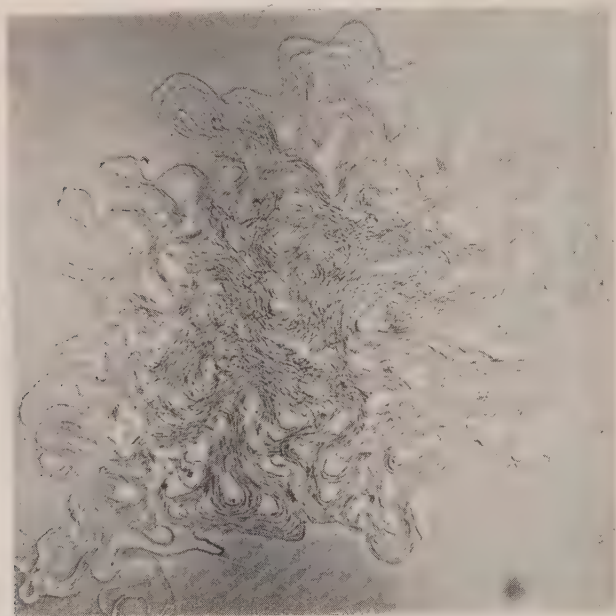


FIG. 4. — Colonie unicellulaire de la variante R de la souche Humaine sur gélose ordinaire âgée de vingt heures à 37°. 400X.

au fond du tube, un dépôt qui se remet en suspension assez difficilement par agitation. Une différence nette s'observe seulement sur sérum coagulé. En effet, sur ce milieu, la colonie S donne une culture très humide, luisante, muqueuse et très adhérente à la spatule, alors que la culture R apparaît mate et sèche. La première est facilement émulsionnable dans l'eau physiologique ; la seconde ne donne qu'une suspension à gros flocons.

POUVOIR PATHOGENE DES VARIANTES R ET S. — Le pouvoir

pathogène des variantes R que nous avons isolées différerait selon les souches. Parmi cinq variantes R que nous avons inoculées au cobaye, trois (Humaine R, Hum. I a R et Hum. II R) n'étaient pas virulentes, deux (Hum. I R et Hum. I b R) gardaient encore une certaine virulence, quoique plus faible que celle des variantes S d'origine (Hum. I R a tué le cobaye en quatre jours et demi jusqu'à la dose de 0 c. c. 01 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures, Hum. I b R en trois jours et demi jusqu'à la dose de 0 c. c. 1, tandis que les variantes S d'origine ont tué le même animal jusqu'aux doses de 0 c. c. 001-0 c. c. 000.1.

Les cultures sur sérum coagulé des deux variantes R virulentes contiennent toujours une faible quantité d'éléments encapsulés et, inoculées dans l'organisme animal, elles font retour à la forme S. En fait, le sang du cœur des cobayes morts après l'inoculation de l'une ou l'autre de ces deux variantes R a donné naissance, sur sérum coagulé, à des colonies lisses composées uniquement de bacilles encapsulés, à côté de colonies rugueuses, semblables à celles des cultures inoculées.

Parmi les trois variantes R non virulentes pour le cobaye, deux (Humaine R et Hum. II R) sont complètement non capsulogènes. Elles sont aussi avirulentes pour la souris quand on les inocule par voie sous-cutanée (elles n'ont pas tué la souris à la dose de 0 c. c. 1 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures, tandis que les variantes S d'origine ont tué le même animal aux doses de 0 c. c. 000.001-0 c. c. 000.000.1.

Afin de suivre l'encapsulation *in vivo* et, éventuellement, la réversion à la forme S des deux variantes R non virulentes, nous en avons fait une suspension très épaisse, dont nous avons inoculé 1 cent. cube, par voie veineuse, à deux cobayes pour chaque variante. Ces animaux ont tous survécu. La culture du sang, prélevé par ponction cardiaque le lendemain de l'inoculation, a été négative. Nous avons ensuite inoculé, par voie péritonéale, deux autres cobayes neufs avec 10 milligrammes de chaque variante, mise en suspension dans 5 cent. cubes d'eau physiologique. Ces animaux aussi ont survécu. Les cultures sur sérum coagulé du liquide péritonéal prélevé pendant les deux jours qui ont suivi l'inoculation n'ont donné

que quelques colonies rugueuses, semblables à celles des deux variantes R inoculées. L'examen microscopique ne nous a pas permis de déceler le moindre élément encapsulé dans les frottis du liquide péritonéal et des colonies rugueuses isolées du liquide péritonéal.

Nous avons répété les mêmes expériences avec deux cultures unicellulaires obtenues à partir d'une des variantes R non virulentes. Les résultats furent identiques aux précédents.

La troisième variante non virulente pour le cobaye (Hum I a R) a cependant présenté une faible virulence pour la souris. La culture sur sérum coagulé contenait toujours une quantité infime d'éléments encapsulés et les frottis de la rate ou du sang du cœur des souris mortes, inoculées avec cette variante, contenaient toujours des bacilles encapsulés. La culture du sang du cœur sur sérum coagulé ne nous a donné pourtant que des colonies rugueuses, semblables à celles de la culture inoculée. Une suspension d'une culture sur gélose du sang du cœur d'une souris morte a été d'une part employée pour l'isolement de germes séparés et, d'autre part, transplantée sur sérum coagulé. Mais, en aucun cas, nous n'avons obtenu de colonies complètement capsulogènes ou complètement acapsulogènes ; les colonies développées contenaient toujours, comme la variante d'origine, une quantité infime d'éléments encapsulés.

b) SOUCHE SCLAVO.

Cette souche est aussi une souche de laboratoire. Nous sommes parti d'une culture de type S, qui, morphologiquement, diffère un peu de la souche Humaine précédente et de la souche 310, récemment isolée, employée dans la troisième expérience. Elle trouble légèrement le bouillon ordinaire ; sur gélose ordinaire, elle donne une culture abondante, dont l'aspect givré est moins net que celui des deux autres souches ; les jeunes colonies sur le même milieu présentent un aspect plus lisse que rugueux, elles sont bombées et à bords assez réguliers. Microscopiquement, elles sont composées non pas de longs filaments, comme c'est le cas pour les autres souches

que nous avons employées, mais de très courts filaments de deux ou trois éléments. La culture sur gélose s'émulsionne très facilement dans l'eau physiologique. Elle est pourtant plus virulente pour le cobaye que la souche Humaine précédente (la dose minima mortelle est de 0 c. c. 000.1-0 c. c. 000.01 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures). Gram positif et sporulation remarquable.

DISSOCIATION *in vitro*. — Des colonies, isolées à partir de spores, ont été obtenues par ensemencement sur sérum coagulé



Fig. 5. — Sclavo S, culture sur sérum coagulé de cheval, âgée de dix-huit heures à 33°. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. Encapsulation très marquée. 900 X.

et sur gélose ordinaire d'une suspension d'une culture du type S sur gélose ordinaire, âgée de quatre jours, à la température du laboratoire, chauffée à 65° pendant trente minutes. Les colonies du sérum coagulé ont toutes présenté l'aspect lisse de la souche d'origine S. Cependant, à côté de colonies caractéristiques de la souche, une autre colonie d'un aspect différent, plate et plus grande, s'est développée sur la gélose. Cette colonie avait tendance à s'étendre à la surface du milieu, en formant, autour d'elle, une zone saillante. Nous en avons transplanté une forte dilution sur sérum coagulé. Les colonies auxquelles elle a donné naissance présentaient, tout d'abord,

presque le même aspect que la colonie lisse, mais avec le temps (trois à quatre jours après l'ensemencement), elles sont devenues de plus en plus rugueuses, sèches et mates. A l'examen microscopique, nous n'avons décelé aucun élément encapsulé dans les frottis. D'après notre nomenclature, nous désignerons cette variante acapsulogène sous le nom de Sclavo R. Contrairement à la culture de la variante S, la culture de la variante Sclavo R s'émulsionne très difficilement dans l'eau physiologique. Tantôt elle trouble le bouillon,

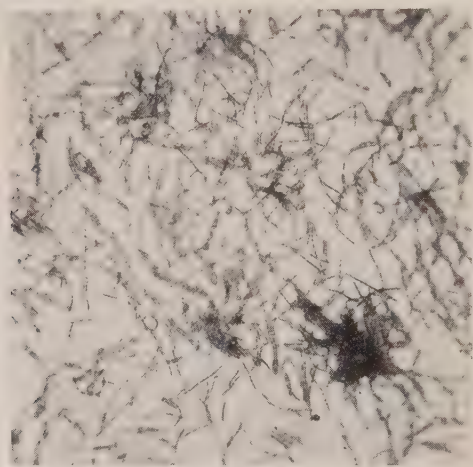


FIG. 6. — Sclavo R, culture sur sérum coagulé de cheval âgée de dix-huit heures à 33°. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. Pas de substance capsulaire. 900 X.

tantôt elle ne le trouble pas. Elle n'a aucun pouvoir pathogène pour le cobaye par inoculation sous-cutanée ou par inoculation intraveineuse. Elle tue la souris, mais ses effets sont différents de ceux de la souche normale de *B. anthracis*. Nous les décrivons ultérieurement.

DISSOCIATION *in vivo*. — Nous avons inoculé, par voie sous-cutanée, à deux cobayes, la suspension bacillaire chauffée, déjà utilisée dans l'expérience *in vitro*. Les animaux sont morts en présentant à l'autopsie les signes d'un charbon typique. Le sang du cœur de l'un d'eux, ensemencé sur gélose,

TABLEAU I. — Titrage de la virulence pour le cobaye des variantes S et R de la souche Sclavo.

CULTURE EN BOUILLON âgée de 24 heures à 37° en cent. cube	SCLAVO S culture unicellulaire	SCLAVO R	SCLAVO (sang) 15 R	SCLAVO (sang) 16 R
1	—	0	+ 5 1/2	+ 4
1/10.	+ 2	0	+ 4	+ 6
1/100	+ 2 1/2	—	—	0
1/1.000	+ 3 1/2	—	—	—
1/10.000.	+ 4 1/2	—	—	—
1/100.000	+ 6 1/2	—	—	—

Nota. — Le chiffre placé après le signe + indique le nombre de jours entre l'inoculation et la mort de l'animal. Le 0 indique la survie des animaux et le signe — indique l'absence d'expérience.

a donné une culture abondante. De cette culture âgée de vingt-quatre heures, nous avons isolé des germes séparés et obtenu 16 cultures unicellulaires. Deux de ces 16 cultures étaient complètement acapsulogènes, tandis que 14 autres s'encapsulaient entièrement. Les 2 cultures non capsulogènes, que nous désignerons sous les noms de Sclavo (sang) 15 R et Sclavo (sang) 16 R, conservent bien leurs caractères morphologiques. Jusqu'à présent (dix mois après l'isolement), nous n'avons trouvé aucun élément encapsulé dans les subcultures sur sérum coagulé. Comme la variante Sclavo R, les cultures sur sérum coagulé de ces deux variantes R s'émulsionnent très difficilement dans l'eau physiologique. Tantôt elles troublent le bouillon, tantôt elles ne le troublent pas.

POUVOIR PATHOGÈNE DES VARIANTES R. — Le tableau I montre la virulence des variantes R pour le cobaye, par comparaison avec une culture unicellulaire du type S.

Les deux variantes R, Scl. (sang) 15 R et Scl. (sang) 16 R, gardent aussi une certaine virulence pour la souris, mais beaucoup plus faible que celle de la variante S.

CARACTÈRES BIOLOGIQUES DES TROIS VARIANTES R.

VARIANTE SCLAVO R. — Cette variante R est totalement avirulente pour le cobaye et pour la souris, en ce sens qu'elle ne

provoque pas de septicémie. Elle ne s'encapsule pas *in vitro* et *in vivo*. Ce qui est particulier à cette variante R, c'est son pouvoir œdématogène. Chez le cobaye, l'inoculation sous-cutanée de 0 c. c. 1 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures provoque un œdème plus ou moins étendu ; chez la souris, la dose de 0 c. c. 001 de la même culture en bouillon et, parfois, la dose de 0 c. c. 000.1 ont le même effet.

Chez le cobaye, l'œdème sous-cutané, qui atteint son maximum le deuxième ou le troisième jour, se résorbe complètement, en laissant parfois un petit nodule au point d'inoculation. Chez la souris, au contraire, l'œdème augmente généralement de volume et finit par s'étendre sur toute la paroi abdominale et costale. Enfin, suivant les doses injectées, les souris meurent entre le troisième jour et le septième, après l'inoculation, sans présenter de septicémie ; à l'autopsie, les organes abdominaux paraissent normaux ; à l'examen microscopique, on trouve dans les frottis de rate, mais très rarement, quelques bactériidies non encapsulées. La culture du sang reste, en général, négative.

Nous avons examiné, à maintes reprises, chez le cobaye et chez la souris, l'encapsulation de la variante Sclavo R par inoculation massive dans la veine ou dans le péritoine. Mais nous n'avons pu déceler aucune trace de substance capsulaire soit par l'examen microscopique des frottis d'organes, soit par la réaction d'Ascoli avec un sérum anticapsulaire. A titre d'exemple, nous donnons le détail de quelques-unes de nos expériences *in vivo* de la variante Sclavo R.

28 avril 1938. 2 cobayes, A 56 et B 8, ont reçu, dans le péritoine, chacun environ 30 milligrammes d'une culture sur gélose de la variante Sclavo R, âgée de vingt-quatre heures, en suspension dans 15 cent. cubes d'eau physiologique.

29 avril 1938. Prélèvement du liquide péritonéal par ponction. *Examen microscopique* : bacilles très rares, tous non encapsulés, sous la forme de courts filaments de deux ou trois éléments. *Culture sur sérum coagulé* : quelques colonies rugueuses, ne contenant aucun élément encapsulé.

30 avril 1938. Le cobaye A 56 est mort. *Autopsie* : pas de lésions charbonneuses ; organes abdominaux intacts. *Examen microscopique* : très rares bacilles, tous non encapsulés, dans les frottis de la rate et de sang du cœur ; bacilles innombrables, tous non encapsulés, dans le

liquide péritonéal. *Réaction d'Ascoli* avec le liquide péritonéal dilué au 1/10 : réaction instantanée et très forte au contact du sérum antisomatique, aucune trace de réaction avec le sérum anticapsulaire.

2 mai 1938. Le cobaye B 8 est mort. *Autopsie et examen microscopique* : mêmes constatations que pour le cobaye A 56. La dilution au 1/10 du liquide péritonéal a réagi fortement et instantanément avec le sérum antisomatique, tandis qu'il n'a donné aucune trace de réaction avec le sérum anticapsulaire.

30 avril 1938. 5 souris ont reçu, sous la peau du ventre, 0 c. c. 01 d'une culture en bouillon de la variante Slavo R, âgée de vingt-quatre heures.

2 mai 1938. Toutes les souris inoculées présentent, au point d'inoculation, un œdème plus ou moins étendu.

3 mai 1938. L'œdème augmente chez les 4 souris dont l'état général semble altéré. Chez la cinquième, il est à peine visible.

4 mai 1938. 2 souris sont mortes, avec un œdème très étendu. *Autopsie* : rate, foie et organes abdominaux normaux. *Examen microscopique* : aucun bacille dans les frottis de sang du cœur. *Réaction d'Ascoli* avec le liquide d'œdème : réaction forte et instantanée avec le sérum antisomatique, aucune trace de réaction avec le sérum anticapsulaire. *Culture sur sérum coagulé du liquide d'œdème* : quelques colonies rugueuses ne contenant aucun bacille encapsulé à l'examen microscopique.

6 mai 1938. 1 souris est morte, avec un œdème très étendu. *Autopsie* : organes abdominaux normaux. *Examen microscopique* : bacilles non encapsulés très rares dans les frottis de sang du cœur et de la rate. *Réaction d'Ascoli* avec l'extrait des tissus œdématisés : réaction instantanée et très forte avec le sérum antisomatique, aucune trace de réaction avec le sérum anticapsulaire. *Réaction d'Ascoli* avec l'extrait aqueux de rate et de cœur ensemble : même résultat qu'avec le liquide d'œdème. *Cultures du sang du cœur* sur sérum coagulé, sur gélose et en bouillon négatives. *Culture du liquide d'œdème* sur sérum coagulé : colonies rugueuses abondantes ne contenant aucun élément encapsulé.

11 mai 1938. Deux autres souris ont survécu.

La variante Slavo R, qui a été gardée à l'état de spores pendant plus de trois mois à la température du laboratoire ne semble pas avoir perdu son pouvoir œdématogène. Chez la souris, elle produit un œdème fort étendu à la dose de 0 c. c. 01 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures. Morphologiquement et biologiquement, elle se comporte comme la souche précédente.

VARIANTES SCLAVO (SANG) 15 R ET SCLAVO (SANG) 16 R. — Ces deux variantes R se comportent de la même manière. Morphologiquement, elles ont le même aspect que la variante Slavo R. Tantôt elles troublent le bouillon, tantôt elles ne

le troublent pas. Leurs cultures sur sérum coagulé ne contiennent pas d'éléments encapsulés et s'émulsionnent très difficilement dans l'eau physiologique. Inoculées au cobaye ou à la souris par voie sous-cutanée, elles provoquent un volumineux œdème comme la variante Sclavo R. Mais, au contraire de celle-ci, elles s'encapsulent *in vivo* et tuent en produisant une septicémie et des signes de charbon plus ou moins marqués. Dans les frottis de rate, de foie et surtout de sang du cœur des animaux morts, inoculés avec ces deux variantes R, on trouve des bacilles bien encapsulés. L'extrait aqueux de rate ou de foie donne toujours une réaction de précipitation très forte avec le sérum antisomatique aussi bien qu'avec le sérum anticapsulaire. La virulence de ces variantes est pourtant beaucoup plus faible que celle de la souche d'origine du type S, comme le montre le tableau I. L'ensemencement sur sérum coagulé du sang du cœur d'animaux morts donne parfois naissance à des colonies d'aspect plus ou moins lisse, qui contiennent un assez grand nombre d'éléments encapsulés. Mais, si on transplante celles-ci de nouveau sur le même milieu ou sur la gélose ordinaire, le pouvoir capsulogène *in vitro* se perd très rapidement ; après 3 ou 6 repiquages effectués de huit jours en huit jours, on ne trouve plus aucun élément encapsulé, tandis que la souche d'origine du type S s'encapsule toujours parfaitement. Voici comment la variante Sclavo (sang) 16 R se comporte dans l'organisme animal.

26 février 1938. 3 souris ont reçu, sous la peau du ventre, 0 c. c. 001 d'une culture en bouillon de la variante Sclavo (sang) 16 R, âgée de vingt-quatre heures, à 37°.

28 février 1938. 1 souris est morte, avec un œdème très étendu, mais ses organes abdominaux étaient normaux. Dans le frottis de rate, on trouve quelques rares bacilles non encapsulés. La culture sur sérum coagulé a donné des colonies rondes, plus ou moins lisses, contenant un assez grand nombre de bacilles encapsulés.

5 mars 1938. Les 2 souris survivantes ont reçu, par la même voie, 0 c. c. 01 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures.

8 mars 1938. Les 2 souris sont mortes, avec un œdème très étendu. La rate hypertrophiée et violacée et le sang du cœur contenaient des bacilles encapsulés assez nombreux. Les cultures sur sérum coagulé du sang du cœur étaient composées de bacilles presque tous encapsulés.

20 mai 1938. 2 souris neuves ont reçu, dans le péritoine, environ

2 milligrammes d'une culture sur gélose de la même variante R, âgée de vingt-quatre heures, à 37°.

23 mai 1938. Les 2 souris sont mortes. *Autopsie* : liquide muqueux abondant, remplissant toute la cavité péritonéale, rate très hypertrophiée et violacée. *Examen microscopique* des frottis de rate : bacilles encapsulés nombreux, bacilles non encapsulés peu nombreux. *Réaction d'Ascoli* avec l'extrait aqueux de rate : réaction instantanée et très forte avec le sérum anticapsulaire aussi bien qu'avec le sérum antisomatique.

A titre de contrôle, nous avons fait en même temps la même expérience avec la variante Sclavo R. Les souris sont mortes sans présenter aucun des signes habituels du charbon. L'extrait aqueux de rate a réagi assez fortement avec le sérum antisomatique, alors qu'il n'a donné aucune trace de précipitation avec le sérum anticapsulaire.

c) SOUCHE 310.

Pour compléter ces résultats nous avons étudié une souche désignée sous le numéro 310, récemment isolée du cadavre d'un cheval charbonneux. Elle possède tous les caractères morphologiques et biologiques typiques de *B. anthracis* : elle tue le cobaye jusqu'à la dose de 0 c. c. 000.001 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures et le lapin jusqu'à la dose de 0 c. c. 000.2; elle s'encapsule très activement sur sérum coagulé.

Dans la troisième expérience, nous avons fait, à partir d'une culture sur gélose âgée de deux semaines, une suspension convenable que nous avons chauffée à 65° pendant trente minutes. De cette suspension qui ne contient que des spores, nous avons isolé quelques-uns de ces éléments séparés et nous avons ainsi obtenu deux cultures unicellulaires. Nous les appellerons respectivement 310 sp. I et 310 sp. II. Ces deux cultures unicellulaires ont présenté, au début, les mêmes caractères morphologiques et biologiques que la souche d'origine. Nous en avons étudié spécialement la dissociation *in vitro*.

DISSOCIATION *in vitro*. — Nous avons ensemencé en bouillon ordinaire la culture unicellulaire 310 sp. II et nous l'avons laissée à la température du laboratoire pendant environ trois mois. Ensemencée directement sur sérum coagulé, la

vieille culture en bouillon a donné naissance, parmi des colonies lisses caractéristiques de la souche d'origine, à des colonies d'aspect rugueux dont la morphologie est presque identique à celle que nous avons décrite pour les variantes R de la souche humaine ; la culture sur sérum coagulé ne contenait que très peu d'éléments encapsulés. A partir d'une des colonies rugueuses, nous avons ensuite isolé 13 cultures unicellulaires qui ont toutes présenté la même morphologie que la colonie rugueuse dont elles provenaient. La virulence des variantes R est beaucoup plus faible que celle de la variante S. Le tableau II montre la virulence pour le cobaye et pour la souris de deux variantes R unicellulaires (310 sp. II R 3 et 310 sp. II R 7), par comparaison avec celle de la souche d'origine du type S.

TABLEAU II. — **Titrage de la virulence des variantes R de la souche 310 par comparaison avec la souche d'origine du type S.**

CULTURE EN BOUILLON agée de 24 heures à 37° en cent. cube	SOUCHE d'origine du type S	VARIANTE R 3	VARIANTE R 7
Chez le cobaye :			
1/10	—	0	0
1/100	—	0	0
1/1 000	+ 2 1/2	0	0
1/10 000	+ 2 1/2	—	—
1/100 000	+ 2 1/2	—	—
1/1.000.000	+ 3 1/2	—	—
Chez la souris :			
1/10	—	+ 5	0
1/100	—	+ 2	+ 7
1/1.000	—	+ 3	0
1/10.000	—	0	0

Nota. — Le chiffre placé après le signe + indique le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la mort de l'animal. 0 indique la survie des animaux et le signe — l'absence d'expérience.

Comme nous l'avons déjà signalé pour les souches Humaine et Sclavo, les variantes S et R ne présentent pas de grandes différences morphologiques sur les milieux ordinaires. Ce qui les distingue, c'est que, sur sérum coagulé, le type S donne des colonies lisses composées de bacilles encapsulés, tandis que

le type R n'en donne pas. C'est aussi le cas pour les variantes S et R de la souche 310. Sur gélose ordinaire, les variantes R ont les mêmes caractères morphologiques que les variantes S.

VARIANTES OPAQUES S ET R. — Cependant, la souche 310 nous a donné une autre variante qui, sur les milieux ordinaires, se distingue très nettement des variantes ordinaires du type S. Celle-ci trouble légèrement le bouillon et, sur gélose ordinaire, contrairement à la variante S, elle donne des colonies plutôt lisses, opaques, de forme ovale ou ronde, à bords

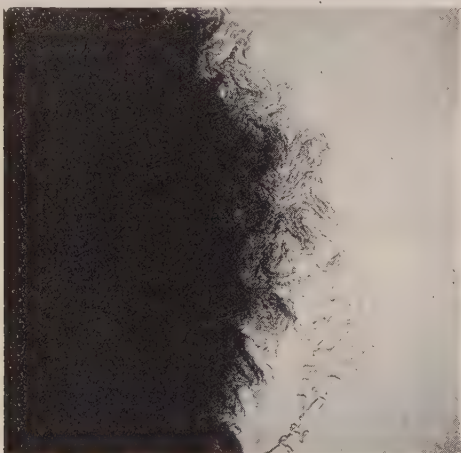


FIG. 7. — 310 sp. II, variante S, colonie unicellulaire sur gélose ordinaire, âgée de vingt-quatre heures à 37°. 90 X.

nettement découpés et moins irréguliers ; ces colonies sont plus petites que celles de la variante S. Morphologiquement, les bacilles apparaissent comme de courts filaments de deux ou trois éléments plus minces que ceux de la variante S. Cette variante, elle aussi, s'encapsule complètement sur sérum coagulé, en donnant des colonies plus petites que celles de la variante S ordinaire ; mais elle est moins virulente que celle-ci. Nous la désignerons sous le nom de variante opaque S, en tenant compte de son pouvoir capsulogène sur sérum coagulé et de son opacité sur la gélose ordinaire (4).

(4) Nous avons également obtenu la même variante opaque S à partir d'une vieille culture en bouillon de la souche 310 sp. I.

17 juin 1938. Nous avonsensemencé sur gélose ordinaire une vieille culture en bouillon de la souche 310 sp. II et le lendemain nous avons

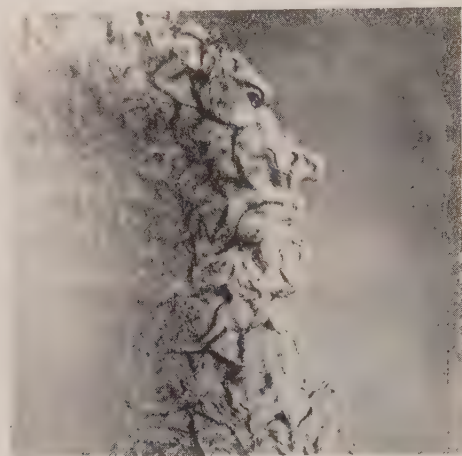


FIG. 8. — 310 sp. II, variante R3, colonie à partir d'un seul élément sur gélose ordinaire âgée de vingt-quatre heures à 37°. 90 X.

fait l'isolement de germes séparés. Nous avons obtenu ainsi 5 colonies dont 3 ont présenté les caractères morphologiques de la variante opaque S

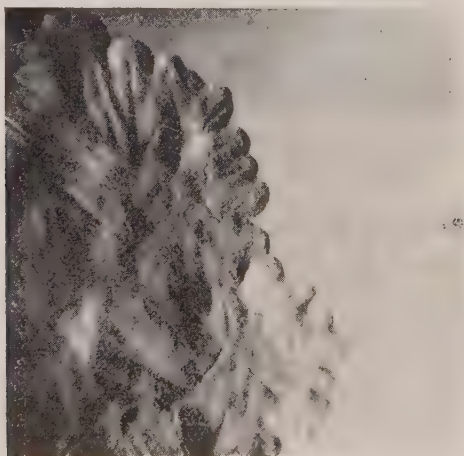


FIG. 9. — 310 sp. II, variante opaque S, colonie à partir d'un seul élément sur gélose ordinaire âgée de vingt-quatre heures à 37°. Elle a été isolée d'une vieille culture en bouillon. 90 X.

que nous venons de décrire. Les autres avaient les caractères habituels des colonies de *B. anthracis*.

Morphologiquement, les variantes opaques S que nous avons obtenues semblent assez stables. Elles ne font pas retour à la forme ordinaire

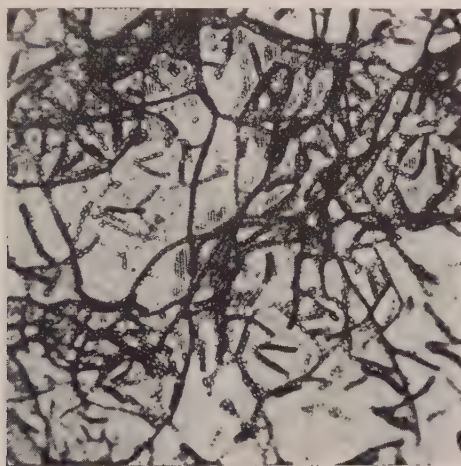


FIG. 10. — 310 sp. II, variante S, culture sur gélose âgée de dix-huit heures à 37°. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. 900 X.

in vitro ou *in vivo*. Le sang du cœur et le liquide d'œdème d'animaux morts de l'infection provoquée par les variantes opaques S nous ont

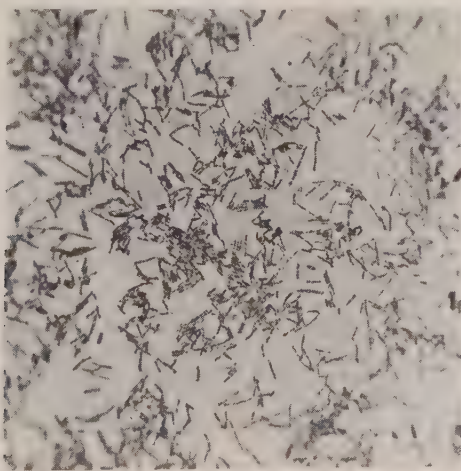


FIG. 11. — 310 sp. II, variante opaque S, culture sur gélose ordinaire âgée de dix-huit heures à 37°. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. 900 X.

donné des colonies ou des cultures qui gardent toujours leur aspect morphologique initial.

Une des variantes opaques S nous a donné également une autre variante non virulente du type R. Celle-ci a été obtenue par ensemen-



FIG. 12. — 310sp. II, variante S, culture sur sérum coagulé âgée de dix-huit heures. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. Encapsulation très marquée. 900 X.

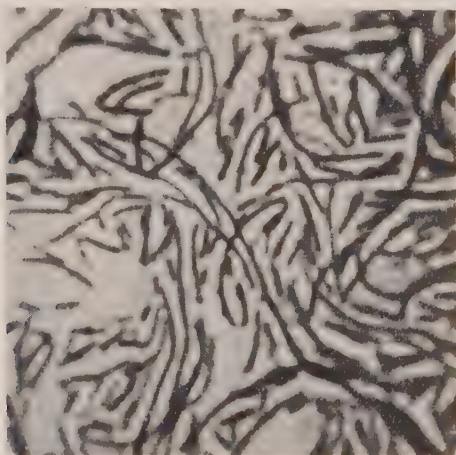


FIG. 13. — 310sp. II, variante opaque S, culture sur sérum coagulé âgée de dix-huit heures. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. Encapsulation parfaite. 900 X.

cement direct, sur sérum coagulé, du liquide d'œdème d'un cobaye mort, inoculé avec une variante opaque S. Comme les autres variantes R,

TABLEAU III. — Titrage de la virulence des variantes opaques S et R.

CULTURE EN BOUILLON âgée de 24 heures à 37° en cent. cube	VARIANTE S culture unicellulaire	VARIANTE opaque S	VARIANTE opaque S (après passage)	VARIANTE opaque R
Chez le lapin :				
1	—	0	0	—
1/10	+ 1 1/2	0	+ 5 ÷	—
1/100	+ 3 1/2	0	—	—
Chez le cobaye :				
1/10	—	+ 2 2/2	0	0
1/100	—	+ 4 1/2	1 1/2	0
1/1.000	—	+ 5	2 1/2	0
1/10.000	+ 2 /12	0	—	—
1/100.000	+ 5	0	—	—
1/1.000.000	0	0	—	—
Chez la souris :				
1/10	—	—	—	0
1/100	—	+ 1 1/2	—	0
1/1.000	—	+ 2 1/2	—	0
1/10.000	—	+ 3 1/2	—	0
1/100.000	—	0	—	—

Nota. — Le chiffre placé après le signe + indique le nombre de jours écoulés entre l'inoculation et la mort de l'animal; 0, indique que les animaux ont survécu; —, l'absence d'expérience. Le signe ÷ signifie que l'animal est mort d'une maladie intercurrente.

elle fournit, sur sérum coagulé, des colonies rugueuses ne contenant pas de bacilles encapsulés. Sur gélose, elle ne diffère pas morphologiquement de la variante opaque S.

Le tableau III indique la virulence des variantes opaques S et R, par

TABLEAU IV. — Titrage de la virulence pour la souris
de la variante opaque R provenant de la variante R3.

CULTURE EN BOUILLON âgée de 24 heures à 37° en cent. cube	VARIANTE R3 d'origine	VARIANTE R3 ordinaire	VARIANTE opaque R
1/10	+ 5	+ 4 1/2	0
1/100	+ 2	+ 2 1/2	0
1/1.000	+ 3	+ 3 1/2	+ 4 1/2 ÷
1/10.000	0	+ 2 1/2 ÷	0
Ces deux variantes ont été isolées, dans les mêmes conditions, à partir de la variante R3 d'origine.			

Nota. — Le signe ÷ placé après le chiffre signifie que l'animal est mort d'une maladie intercurrente.

comparaison avec celle d'une culture unicellulaire du type S ordinaire, isolée en même temps qu'elles à partir de la souche 310 sp. II.

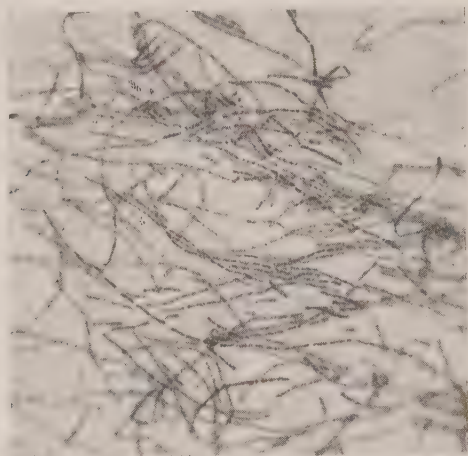


FIG. 14. — 310 sp. II, variante R3, culture sur sérum coagulé âgée de vingt-quatre heures. Coloration au bleu de méthylène de Löffler. Aucune encapsulation. 900X.

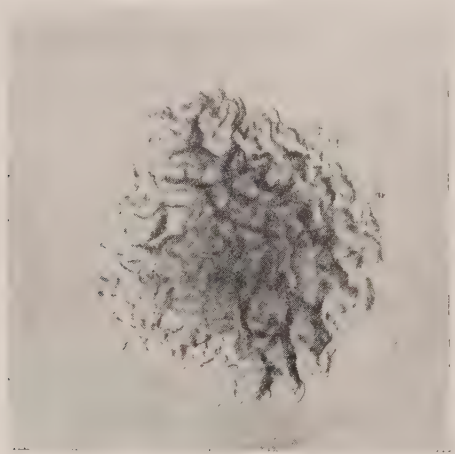


FIG. 15. — 310 sp. II, variante R3, colonie unicellulaire du type ordinaire sur gélose âgée de vingt-quatre heures à 37°. 90X.

Nous avons également obtenu une variante opaque R non virulente à partir de la variante R 3 de la souche 310 sp. II.

Une culture sur gélose de la variante R 3 a été laissée à la température du laboratoire pendant trois semaines. Au bout de ce temps,

elle a été transplantée sur le même milieu et le lendemain nous avons fait l'isolement des germes séparés. C'est ainsi que nous avons nette-



FIG. 16. — Colonie unicellulaire sur gélose de la variante opaque h isolée de la variante R3 de la souche 310 sp. II. 90 X.

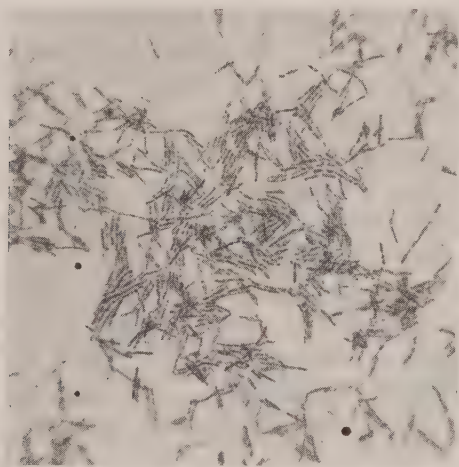


FIG. 17. — Culture sur sérum coagulé de la variante opaque R isolée de la variante R3. Coloration au bleu de méthylène. Aucune encapsulation. 900 X.

ment vu apparaître deux types de colonies, l'une ayant l'aspect ordinaire des colonies de *B. anthracis* (fig. 15) l'autre exactement identique à la colonie de la variante opaque C (fig. 16).

La variante opaque que nous avons isolée à partir de la variante R 3 se comporte, morphologiquement et biologiquement, comme la variante opaque R obtenue à partir de la variante opaque S virulente. Toutes deux troublent fortement le bouillon. Elles ne s'encapsulent pas sur sérum coagulé (fig. 17). Leurs cultures sur gélose ordinaire ou sur sérum coagulé se composent de très courts filaments, beaucoup plus minces que ceux de la souche ordinaire de *B. anthracis*. La variante opaque est totalement avirulente pour la souris de R 3 par voie sous-cutanée. Mais si on l'inocule à dose massive par voie veineuse (0,1-1 milligramme), elle tue la souris. Dans les frottis de rate ou de sang des souris mortes, on trouve des bacilles encapsulés, à côté de bacilles non encapsulés. Pour ces deux variantes opaques R, le passage de souris à souris est donc possible, si on l'effectue par la voie veineuse. Nous avons fait ainsi deux passages avec la variante opaque R de la variante R 3 et 5 passages avec la variante opaque R de la variante opaque S. Après les passages, elles ont gardé leurs caractères morphologiques et biologiques initiaux. Leur virulence n'en a pas été exaltée : aucune des souris inoculées par voie sous-cutanée avec les cultures de passage n'est morte.

En résumé, toutes ces observations montrent nettement que *B. anthracis* est capable de se dissocier *in vitro* et *in vivo*. Il résulte de nos expériences, faites à partir de germes uniques ou de spores uniques, que cette dissociation de la bactériodie n'est pas liée à l'hétérogénéité des cultures d'origine. Nous pensons plutôt que c'est le plastide microbien lui-même qui subit des modifications temporaires ou permanentes. De même que pour les autres microbes, la dissociation de *B. anthracis* est un phénomène de dégradation qui se traduit entre autres par la perte de la propriété capsulogène et de la virulence ; il survient brusquement ou graduellement selon les circonstances de la végétation.

Il semble que ce retour de la forme R à la forme S s'opère entre certaines limites ; celles-ci dépassées, la variante R ne ferait plus retour à la variante S.

L'exemple de la variante Sclavo R montre que le pouvoir capsulogène et le pouvoir œdématogène sont dissociables l'un de l'autre.

L'hypothèse de culture mixte peut être écartée en tenant compte de toutes les précautions prises dans nos expériences.

III. — Variantes asporogènes de *B. anthracis*.

Déjà à l'époque où ils s'occupaient plus spécialement de la morphologie des microbes, les bactériologistes avaient observé l'apparition de variantes non sporogènes chez les microbes sporogènes comme *B. anthracis*.

Comme chacun sait, *B. anthracis* ne sporule pas lorsque la température est inférieure à 16° ou supérieure à 40°. Ce qui a conduit Pasteur, puis Phisalix à obtenir une race non-sporogène par incubation de cultures de bactériidies à la haute température de 42° (1883-1893).

Roux et Chamberland (1883) eurent les mêmes résultats en cultivant *B. anthracis* sur des milieux additionnés d'acide phénique ou de bichromate de potasse.

Behring et Eisenberg (1889) ont employé, pour la même fin, l'acide rosolique et la culture en série sur gélose glycinée.

Récemment, Bordet et Renaux (1930) ont signalé l'influence du calcium dans la sporogénèse. En cultivant une souche de bactériдие sporogène sur des milieux contenant du calcium, ils ont obtenu deux variantes, l'une sporogène, l'autre non-sporogène. Alors que la première était virulente, la seconde était complètement dépourvue de pouvoir pathogène.

Plus récemment (1935), N. Stamatin a obtenu deux variantes non-sporogènes par passages en sang défibriné de cheval. Les variantes non-sporogènes sont plus virulentes que les souches d'origine et que les variantes sporogènes isolées en même temps après le même nombre de passages.

Si ces expériences prouvent que l'on peut obtenir des races non-sporogènes à partir des races sporogènes, on ne peut décider s'il s'agit d'une sélection d'éléments préexistants ou d'une manifestation de la variabilité microbienne. C'est pour cette raison que nous avons cherché à cultiver des variantes non-sporogènes à partir de germes uniques, filaments bactériidiens ou spores.

SOUCHE HUMAINE S.

En premier lieu, nous avons isolé 4 cultures unicellulaires à partir de la souche Humaine S. Elles ont présenté les mêmes

caractères morphologiques et presque le même pouvoir pathogène que la souche-mère. Mais, chez l'une, le pouvoir sporogène était très faible, tandis que les 3 autres sporulaient très fortement, comme la souche-mère. A partir de la culture peu sporogène, nous avons isolé, après quelques passages sur gélose ordinaire, 8 cultures unicellulaires qui étaient toutes plus ou moins sporogènes : même quand, à l'examen microscopique, leurs cultures ne paraissaient contenir aucune spore, elles résistaient encore au chauffage à 85° pendant cinq minutes ou à 65° pendant quinze minutes.

Dans la suite, nous avons inoculé à des cobayes la moins sporogène de ces 8 cultures unicellulaires. Sa virulence était presque égale à celle de la souche-mère. Ensemencé sur gélose ordinaire, le sang du cœur des animaux tués par l'inoculation de cette culture a donné une abondante végétation fortement sporogène. A partir d'une de ces cultures sur gélose ou des subcultures, nous avons obtenu 50 cultures unicellulaires pendant les trois jours qui ont suivi l'ensemencement du sang. La sporulation de ces 50 cultures a été examinée après quatre jours de séjour à l'étuve à 37°. Les unes étaient fortement sporogènes, d'autres faiblement et 9 étaient complètement dépourvues de pouvoir sporogène.

Tuées par chauffage à 85° pendant 5 minutes ou à 65° pendant quinze minutes, les 9 cultures unicellulaires sont restées strictement non-sporogènes dans les subcultures. Sur gélose sans peptone, elles se développent mal et ne sporulent pas. Elles y meurent en dix ou quinze jours. La durée de leur vie sur gélose ordinaire semble dépendre de l'humidité de ce milieu : s'il est humide, elles continuent à se multiplier. Une souche non-sporogène *b* 23, transplantée sur gélose bien capuchonnée, était encore vivante à la température du laboratoire après plus de deux mois.

Morphologiquement, les variantes non-sporogènes que nous avons obtenues sont plutôt du type R : sur sérum coagulé, elles présentent un aspect rugueux, sec et mat, et leurs cultures ne contiennent que très peu d'éléments encapsulés. Sur gélose ordinaire, elles forment une couche très mince et sèche qui, parfois, ne se voit nettement qu'à la lumière ; cette couche se compose de courts filaments plus minces que ceux d'une souche

ordinaire. Comme celle-ci, les variantes non-sporogènes ne troublent pas le bouillon ordinaire ; elles y forment un dépôt qui se remet en suspension assez facilement par agitation.

Les 9 variantes non-sporogènes ont présenté à peu près la même virulence pour le cobaye que la souche-mère, peu de temps après l'isolement. Le sang du cœur et le liquide d'œdème des animaux morts après l'inoculation de ces variantes non-sporogènes ne nous ont pourtant donné que des cultures non-sporogènes, toujours stérilisables à 63° pendant quinze minutes et semblables à celles qui avaient été inoculées.

La virulence des variantes non-sporogènes s'affaiblit avec le temps : huit mois après l'isolement, la variante non-sporogène *b* 23, que nous avons étudiée particulièrement, avait perdu complètement son pouvoir pathogène pour le cobaye.

STABILITÉ *in vivo* DE LA VARIANTE NON-SPOROGÈNE *b* 23. — Nous avons inoculé par voie sous-cutanée un ou deux cobayes neufs avec environ 0 c. 2 du sang du cœur d'un cobaye mort, inoculé avec cette variante, et ainsi de suite pendant 5 passages. Les animaux sont morts régulièrement en moins de trente-six heures après l'inoculation, en présentant, à l'autopsie, tous les signes du charbon. Cependant, toutes les cultures retirées soit du sang du cœur, soit du liquide d'œdème sont restées strictement asporogènes. Pour les tuer complètement, il suffisait de les chauffer à 50° pendant vingt minutes. Dans les frottis de sang du cœur ou de rate, les bacilles étaient tantôt tous encapsulés, tantôt tous non encapsulés ou presque. Mais le sang du cœur des animaux morts,ensemencé directement sur sérum coagulé, n'a donné que des colonies rugueuses, ne contenant que très peu d'éléments encapsulés et semblables à celles de la culture inoculée. Il est à noter que, pour un cobaye chez lequel nous n'avons trouvé microscopiquement que des bacilles non encapsulés, l'extrait aqueux de rate a donné la réaction de précipitation avec le sérum anticapsulaire aussi bien qu'avec le sérum antisomatique de *B. anthracis*.

VARIANTES NON-SPOROGÈNES OBTENUES *in vitro*. — D'autre part nous avons également obtenu *in vitro* deux autres variantes non-sporogènes, l'une à partir d'une vieille culture en bouillon

de la souche humaine S d'origine, par ensemencement d'une dilution très étendue, l'autre dans les mêmes conditions, à partir d'une culture unicellulaire nommée Humaine S II, par la méthode d'isolement de germes uniques. Ces deux variantes asporogènes étaient aussi du type R. Contrairement aux variantes asporogènes que nous avons obtenues *in vivo*, elles étaient, dès l'isolement, complètement dépourvues de virulence pour le cobaye et pour la souris. Les cultures sur gélose ordinaire des deux variantes asporogènes ont perdu toute vitalité après deux mois de séjour à la température du laboratoire.

Le tableau V indique la virulence pour le cobaye des trois variantes asporogènes de la même origine, b 23 et deux autres obtenues *in vitro*, par comparaison avec celle de la souche-mère Humaine S sporogène.

TABLEAU V. — Titrage de la virulence pour le cobaye des variantes asporogènes obtenues à partir de la souche Humaine S.

CULTURE EN BOUILLON âgée de 24 heures à 37° en cent. cube	SOUCHE MÈRE Humaine S sporogène	VARIANTE non-sporogène de Humaine S	VARIANTE non-sporogène de Humaine S2	VARIANTE non-sporogène b23 (15 décembre 1937)	VARIANTE non-sporogène b23 après 8 mois (19 août 1938)
1	+ 2 1/2	0	0	+ 1 1/2	—
1/10	+ 2 1/2	0	0	+ 2	0
1/100	+ 2 1/2	0	—	+ 2 1/2	0
1/1.000	+ 5 1/2	0	—	—	0
1/10.000	0	—	—	—	—

Nota. — Le chiffre placé après le signe + indique le nombre de jours entre l'inoculation et la mort de l'animal. 0 indique la survie des animaux; le signe — indique l'absence d'expérience.

Peu de temps après l'isolement, la variante asporogène b 23 tuait la souris jusqu'à la dose de 1/100.000 cent. cube d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures à 37°, tandis que deux autres variantes non-sporogènes obtenues *in vitro* se sont montrées non virulentes pour cet animal, même à la dose de 1/10 cent. cube.

SOUCHE 310.

De la souche 310, nous avons obtenu facilement deux variantes non-sporogènes à partir des deux cultures unicellulaires, l'une d'un germe unique, l'autre d'une spore unique (310 sp. I).

En premier lieu, nous avonsensemencé, sur plusieurs tubes de gélose ordinaire, une culture unicellulaire très diluée, âgée de cinq jours sur le même milieu, afin d'examiner la morphologie des colonies et la sporulation. Nous avons obtenu ainsi 12 colonies bien séparées les unes des autres. 11 de ces colonies ont présenté la morphologie typique du *B. anthracis*, la dernière avait un aspect différent. Celle-ci a continué à végéter à la température du laboratoire en formant une couche très mince sur le milieu, tandis que les autres sont devenues sèches et ne se sont plus développées. Après quatre jours de séjour à 37°, alors que les 11 colonies se sont montrées fortement sporogènes, nous n'avons trouvé aucune spore dans les frottis de cette colonie d'aspect différent. Transplantée sur gélose ordinaire, elle est restée strictement asporogène : ses subcultures sur gélose, ainsi que les cultures du sang du cœur des cobayes inoculés avec cette variante asporogène, n'ont pas résisté au chauffage à 65° pendant quinze minutes, cinq, dix et quinze jours après le repiquage ou l'ensemencement.

D'autre part, nous avons également obtenu avec la souche unicellulaire 310 sp. I, une autre variante non-sporogène. Celle-ci a été isolée à partir d'une vieille culture en bouillon, âgée de plus de deux mois, par ensemencement d'une suspension très diluée sur gélose ordinaire, en même temps qu'une variante opaque S, dont nous avons déjà décrit les caractères. Comme la précédente, elle est restée strictement asporogène dans les subcultures. Nous n'avons pas pu lui restituer son pouvoir sporogène par passage chez l'animal.

Au point de vue morphologique, les deux variantes non-sporogènes sont plutôt du type R : elles s'encapsulent très mal sur sérum coagulé, en donnant des colonies rugueuses semblables à celles de la variante R ordinaire. Sur gélose ordinaire, elles forment une couche mince qui continue à s'ac-

croître à la température de la chambre, tant que le milieu reste convenablement humide. Les bacilles semblent un peu plus minces que ceux de la souche-mère, et, comme eux, ils poussent en longs filaments.

Peu de temps après l'isolement, les deux variantes avaient presque la même virulence que la souche-mère pour le cobaye.

En résumé, nos expériences faites à partir d'un germe unique ou d'une seule spore, montrent que la race asporogène du *B. anthracis* a pour origine la race sporogène. D'autre part, nous pensons que la race sporogène de *B. anthracis* a originellement une tendance à donner, spontanément et graduellement, la race asporogène, même dans les conditions ordinaires. L'action des divers agents chimiques ou physiques n'aurait pour résultat que de favoriser cette tendance. Le fait que quelques-unes de nos variantes asporogènes gardent encore un pouvoir pathogène assez élevé prouve qu'il n'y a aucun rapport direct entre la sporulation et la virulence, comme le montrent nos expériences sur la dissociation. Cependant, nous pensons que la tendance à la production de races non-sporogènes est aussi un phénomène de dissociation.

IV. — Essai d'immunisation anticharbonneuse avec les variantes R isolées.

On sait aujourd'hui que *B. anthracis* n'a pratiquement aucun pouvoir immunisant, s'il est tué par chauffage ou par divers agents chimiques, quels que soient le mode de vaccination et l'origine des souches employées. C'est pour cette raison qu'on utilise, pour l'immunisation anticharbonneuse, uniquement des bactéries vivantes atténuées, comme les vaccins de Pasteur.

Dans le mécanisme de l'immunité anticharbonneuse, Bail attribua un rôle important à l'œdème produit par les bactériodies et il a réussi, ainsi que de nombreux autres auteurs, à conférer un certain degré d'immunité par l'injection de liquide d'œdème. Il signala aussi que les propriétés capsulogènes et œdématogènes du *B. anthracis* peuvent se dissocier.

Cette constatation de Bail a été récemment confirmée par

N. Stamatin. Celui-ci a obtenu, par culture de la bactériodie dans du sang défibriné de cheval, des variantes se développant en colonies muqueuses sur la gélose ; ces colonies, à leur tour, peuvent donner naissance à une variante R non-capsulogène qui, inoculée par voie sous-cutanée, peut produire un œdème sans septicémie. Au moyen de cette variante non-capsulogène et œdématogène, N. et L. Stamatin ont réussi à conférer au mouton et au lapin une immunité solide. Aussi concluent-ils que l'immunité produite par *B. anthracis* est liée à ses propriétés œdématogènes ; le pouvoir capsulogène ne joue aucun rôle.

Plus récemment, Sterne a étudié le pouvoir immunisant des variantes R qu'il avait isolées. Les unes se sont montrées fort actives, tandis que les autres ne l'étaient pas ou peu. Sterne pense aussi que le *B. anthracis* contient un facteur immunisant qui peut varier indépendamment de la virulence.

Pour notre part, nous avons examiné chez le cobaye le pouvoir immunisant de nos variantes R, non virulentes ou peu virulentes.

1° EXPÉRIENCE AVEC LA VARIANTE NON-SPOROGENE *b* 23 ET LA VARIANTE R HUMAINE II R.

5 cobayes ont reçu sous la peau environ 2 milligrammes de la variante Humaine II R, âgée de vingt-quatre heures à 37° sur gélose ordinaire, un autre lot égal a reçu la même quantité de la variante *b* 23. Sept jours après, chaque lot a reçu, également sous la peau, environ 3 milligrammes de chaque variante correspondante. La variante non-sporogène *b* 23 a été stérilisée avant chaque injection par chauffage à 56° pendant trente minutes, à cause de sa virulence élevée pour le cobaye. Au cours de l'immunisation, deux cobayes de chaque lot sont morts de maladie intercurrente. Deux semaines après la dernière injection, tous les cobayes survivants, ainsi que 2 cobayes témoins, ont été éprouvés par voie sous-cutanée, avec 0 c. c. 001 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures à 37° de la souche d'origine Humaine S (dose minima mortelle de la souche Humaine S comprise entre 0 c. c. 001 et 0 c. c. 0001). Tous les animaux traités, ainsi que les témoins,

sont morts dans les deux jours qui ont suivi l'injection d'épreuve.

2° EXPÉRIENCE AVEC LES VARIANTES SCLAVO R ET SCLAVO 16 R
(tableau VI).

Tous les cobayes ont reçu des cultures en bouillon âgées de vingt-quatre heures à 37°. Ils ont été éprouvés avec la souche d'origine Sclavo S, dont la dose minima mortelle est comprise entre 0 c. c. 0001 et 0 c. c. 00001 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures à 37°.

TABLEAU VI.

	1 ^{re} INJECTION sous la peau 14 mai 1938 en cent. cube	2 ^e INJECTION 21 mai 1938 en cent. cube	INJECTION d'épreuve avec Sclavo S en cent. cube	NOMBRE DE JOURS entre l'injection d'épreuve et la mort des animaux
Cobayes traités avec Sclavo R :				
A196.	0,1	1	0,1	Survie.
A197.	0,1	1	0,1	Survie.
A198.	0,1	1	0,1	Survie.
A199.	0,1	1	0,1	Survie.
Cobayes traités avec Sclavo 16 R :				
A1.100.	0,1 + 16/5			
B1.	0,1	1	0,1	Survie.
B2.	0,1 + 20/5			
B3.	0,1	1	0,1	+ 10
Témoins :				
1			0,000 5	2 1/2
2			0,000 5	3 1/2
3			0,000.5	4

Il ressort de la lecture du tableau VI que la variante Sclavo R a un pouvoir immunisant remarquable. Comme nous l'avons déjà exposé, c'est une variante œdématogène non capsulogène. Elle est totalement avirulente pour le cobaye. A la première injection, les cobayes qui avaient reçu cette variante ont présenté au point d'inoculation un œdème plus ou moins étendu qui s'est complètement résorbé en deux ou trois jours. Parmi les cobayes traités avec la variante Sclavo 16 R, deux

VARIABILITÉ DE *B. ANTHRACIS*

441

TABLEAU VII.

	PREMIÈRE INJECTION 28 juillet 1938	DEUXIÈME INJECTION 2 août 1938	TROISIÈME INJECTION 10 août 1938	INFECTION D'ÉPREUVE avec la souche 310 30 août 1938 en cent. cube	NOMBRE DE JOURS entre l'inoculation et la mort des animaux
Cobayes traités avec Humaine I R :					
1	0 c. c. 2 sous la peau.	0 c. c. 2 sous la peau.	1 c. c. sous la peau.	0.000,02	Survie.
2	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
3	Id.	Id.	Id. + 21/8		
4	Id.	Id.	Id. + 17/8		
5	Id.	Id.	Id. + 17/8		
6	Id.	Id. + 3/8			
Cobayes traités avec Humaine Ia R :					
1	Id.	0 c. c. 2 sous la peau.	1 c. c. sous la peau.	0.000,02	Id.
2	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
3	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 4
4	Id.	Id.	Id.	0.000,2	+ 2 1/2
5	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 3 1/2
6	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 4 1/2
Cobayes traités avec Sclavo R :					
1	Id.	Id.	Id.	0.000,02	Survie.
2	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
3	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
4	Id.	Id.	Id.	0.000,2	Id.
5	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 3 1/2
6	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 3 1/2
Cobayes traités avec Sclavo R16 :					
1	Id.	Id. + 7/8			
2	Id.	Id. + 7/8			
3	Id.	Id. + 7/8			
4	Id.	Id. + 7/8			
5	Id.	Id. + 7/8			
6	Id.	Id. + 5/8			
Cobayes traités avec 310Sp. II R3 :					
1	Id.	0 c. c. 2 sous la peau.	Id.	0.000,02	Survie.
2	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
3	Id.	Id.	Id.	0.000,2	+ 2 1/2
4	Id.	Id.	Id. + 20/8 +		
Cobayes traités avec 310Sp. II R.7 :					
1	Id.	Id.	1 c. c. sous la peau.	0.000,02	Survie.
2	Id.	Id.	Id.	Id.	Id.
3	Id.	Id.	Id.	0.000,2	+ 2
4	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 3 1/2

	PREMIÈRE INJECTION 28 juillet 1938	DEUXIÈME INJECTION 2 août 1938	TROISIÈME INJECTION 10 août 1938	INJECTION D'ÉPREUVE avec la souche 310 30 août 1938 en cent. cube	NOMBRE DE JOURS entre l'inoculation et la mort des animaux
Cobayes traités avec 310 variante opaque R :					
1	0 c. c. 2 sous la peau.	0 c. c. 2 sous la peau + 3/8 +	1 c. c. sous la peau.	0 000,01	Survie.
2	Id.	0 c. c. 2 sous la peau.	Id.	Id.	Id.
3	Id.	Id.	Id.	Id.	+ 2 1/2
4	Id.	Id.			
Témoins :					
1				0.000,002	+ 2
2				Id.	+ 3 1/2
3				Id.	+ 3 1/2
4				Id.	+ 4 1/2

sont morts au cours de l'immunisation, en présentant un œdème fort étendu et des symptômes de charbon typiques. La variante Sclavo 16 R, malgré son aspect parfaitement rugueux, garde encore une certaine virulence pour le cobaye. Elle s'encapsule *in vivo* comme nous l'avons déjà indiqué. Un des cobayes survivants du lot Sclavo 16 R a présenté tardivement au point d'inoculation un faible œdème qui augmenta dans la suite ; l'animal est mort de charbon typique au bout de dix jours. L'autre cobaye et ceux du lot Sclavo R ont supporté l'injection d'épreuve sans présenter même le plus léger œdème.

3° Nous avons étudié le pouvoir immunisant des variantes Sclavo R et Sclavo 16 R à l'égard d'une souche hétérogène. Nous avons examiné en même temps les variantes de la souche Humaine I R, peu virulente, et de la souche Humaine I a R non virulente, isolées de la souche Humaine S et trois autres variantes R non virulentes isolées de la souche 310 : 310 sp. II R 3, 310 sp. II R 7 et 310 variante opaque R. Tous les animaux traités ont été éprouvés avec la souche 310 gardée à la glacière à l'état de spores. (Cette souche tue le cobaye jusqu'à la dose de 0 c. c. 000.001 d'une culture en bouillon âgée de vingt-quatre heures à 37°).

Il ressort de la lecture du tableau VII que les différentes variantes R, non virulentes ou peu virulentes, ont un certain pouvoir immunisant contre l'infection charbonneuse. C'est la variante Sclavo R qui est la plus intéressante et d'autant plus qu'on en peut utiliser des quantités massives pour l'immunisation, sans aucun inconvénient. Comme cette variante R est non capsulogène *in vitro* et *in vivo* et totalement avirulente, il est clair que le pouvoir immunisant et la virulence de *B. anthracis* sont dissociables et que le premier ne dépend pas de la substance capsulaire. En outre, notre expérience confirme l'opinion de Bail et de N. et L. Stamatin, suivant laquelle il existe une étroite liaison entre le pouvoir immunisant et le pouvoir œdématogène des variantes de *B. anthracis*.

Résumé et conclusion.

1° Nous avons étudié la variabilité de 3 souches de *B. anthracis* ; 2 souches de laboratoire, 'Humaine et Sclavo et 1 souche récemment isolée, 310, à partir de germes uniques ou de spores uniques séparés au moyen du micromanipulateur et de la méthode d'isolement de Nakamura (film-culture).

2° Ces 3 souches se dissocient *in vitro* et *in vivo*. Les différences morphologiques entre les colonies S et R ne s'observent que sur sérum coagulé de cheval. En effet, sur ce milieu les variantes S donnent des colonies lisses, humides, rondes ou ovales et à bords réguliers, tandis que les variantes R donnent des colonies rugueuses, sèches, plates et à bords irréguliers. Sur les milieux ordinaires, les deux variantes S et R se développent presque de la même manière. Par exemple, sur gélose ordinaire, elles ne donnent que des colonies rugueuses d'aspect givré et en « tête de Méduse », qui ne se distinguent pas l'une de l'autre.

3° Sur sérum coagulé, la variante S s'encapsule complètement, tandis que la variante R ne s'encapsule pas ou presque pas.

4° La variante S présente tous les caractères morphologiques et biologiques de *B. anthracis* normal ; elle est virulente, tandis que la variante R est peu ou pas virulente.

5° Parmi les variantes R que nous avons isolées, quelques-unes ont fait retour à la forme S, par passages dans l'organisme animal. Le phénomène de dissociation étant considéré comme un phénomène de dégradation, il semble qu'il y ait une certaine limite au delà de laquelle la variante R ne fait plus retour à la forme S.

6° La plupart des variantes R que nous avons obtenues sont plus ou moins capsulogènes dans l'organisme animal, bien qu'elles soient non capsulogènes sur sérum coagulé et qu'elles ne fassent pas retour à la forme S. Tant qu'elles sont capsulogènes, si peu que ce soit, elles manifestent encore une certaine virulence pour la souris, quoique beaucoup plus faible que celle de la variante S. Une seule variante Sclavo R est complètement acapsulogène *in vitro* et *in vivo* et complètement avirulente pour le cobaye et la souris, en ce sens qu'elle ne provoque pas de septicémie, mais elle est douée d'un pouvoir œdématogène considérable ; ce qui nous permet de confirmer le fait constaté par Bail et, récemment, par N. et L. Stamatini, que les fonctions capsulogène et œdématogène de *B. anthracis* sont dissociables l'une de l'autre.

7° Pour la souche 310, nous avons pu mettre en évidence une autre catégorie de variantes, que nous appelons variantes opaques. Celles-ci diffèrent nettement des variantes ordinaires S et R par l'aspect lisse, l'opacité et la petite taille de leurs colonies sur gélose ordinaire. Elles troublent fortement le bouillon et sont composées de bacilles plus minces que ceux des variantes ordinaires et disposés en courts filaments de trois ou quatre éléments. Ces variantes se dissocient, elles aussi, en deux types S et R. Cette dissociation ne s'observe que sur sérum coagulé, comme c'est le cas pour les variantes ordinaires. Comme celles-ci, les variantes opaques S sont capsulogènes et virulentes, tandis que les variantes opaques R sont acapsulogènes ou peu capsulogènes et avirulentes ou peu virulentes.

8° Nous avons isolé, des souches Humaine et Sclavo, plusieurs variantes asporogènes stables et stérilisables par chauffage à 65° pendant quinze minutes ou à 85° pendant cinq minutes, à partir des cultures données par un germe unique ou par une spore unique. Il est donc certain que la

race asporogène du *B. anthracis* a pour origine la race sporogène. Certaines de nos variantes asporogènes se sont montrées presque aussi virulentes que les souches d'origines sporogènes, tandis que les autres étaient complètement avirulentes dès l'isolement. La virulence de la race asporogène dépendrait donc des conditions du milieu où la race sporogène vit et se multiplie.

9° Nos variantes asporogènes étaient plutôt du type R : elles ne s'encapsulaient pas ou presque pas sur sérum coagulé. Mais celles qui étaient virulentes s'encapsulaient dans l'organisme animal.

10° La plupart de nos variantes R de bactériidies ont un certain pouvoir immunisant contre l'infection charbonneuse. Celle qui est la plus intéressante, tant au point de vue théorique qu'au point de vue pratique, c'est la variante Sclavo R non capsulogène et œdématogène. Nous croyons, à l'appui de nos expériences, que le pouvoir immunisant et la virulence de *B. anthracis* sont dissociables l'un de l'autre, mais il apparaît, comme le pensent N. et L. Stamatin, qu'il y a une relation étroite entre le pouvoir immunisant et le pouvoir œdématogène.

11° Ces expériences, faites à partir de germes uniques ou de spores uniques, tendent à établir que la variabilité de *B. anthracis* n'est pas due à l'hétérogénéité des souches d'origine. Il semble plutôt que c'est le plastide microbien lui-même qui est sujet à subir des modifications temporaires ou permanentes traduites par la dissociation. L'hypothèse de cultures mixtes peut donc être écartée.

BIBLIOGRAPHIE

- ABT. *C. R. Soc. Biol.*, **84**, 1921, p. 627.
BAIL. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, orig.*, **75**, 1915, p. 159 ; *Ibid.*, **76**, 1915, p. 38.
BEHRING. Cité par Sobernheim.
BORDET et RENAUX. *Ces Annales*, **45**, 1930 ; **49**, 1932.
CHAMBERLAND et ROUX. Cité par Marchal.
CHODAT. Cité par Marchal, 1926.
EISENBERG. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, orig.*, **63**, 1912, p. 305. — **73**, Heft 2, 1914, p. 81.
GUYENOT. *La Variation et l'Evolution*, **2**, p. 147.

- HENRI. *C. R. Acad. Sciences*, **159**, 1914, p. 340.
- HAAG. *Arch. f. Hyg.*, **98**, 1927.
- KYO. *Journ. of the Ch. Med. Associat.*, **25**, n° 7, 1935.
- MARCHAL. *Variation et Mutation en Bactériologie*, Paris, 1932.
- MUNGSTER. *Journal Inf. Dis.*, **44**, 1929, p. 73.
- PREISZ. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. I*, orig., **44**, p. 209. — **47**, p. 585 ; *Ibid.*, **58**, p. 510.
- ROSENTHAL. *C. R. Soc. Biol.*, **95**, 1926, p. 445.
- RAMON et STAUB. *C. R. Soc. Biol.*, **119**, 1935, p. 1073.
- SOBERNHEIM. *Handbuch der Pathogenen Microorganismen*, **3**, Auflage 1931.
- STAMATIN (N.). *Archiva veterinara*, **1-2**, 1935, a. 26 ; **1-2**, 1935, a. 27 ; *Ces Annales*, **61**, 1938.
- STAMATIN (N. et L.). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 494.
- SCHIEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 897 et 1178.
- SCHIEFER (W.) et SANDOR (G.). *C. R. Soc. Biol.*, **126**, 1937, p. 187.
- SURMONT et ARNOULD. *Ces Annales*, **8**, 1894, p. 817.
- STERNE. *Ouderstepoort Journ. Veterin. and Anim. Scienc. Indust.*, **8**, n°s 1 et 2, 1937.
- TAKAHASHI (Y.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 399 et 960.
- TOMCSIK. *Zeitschr. f. Imm.*, **83**, n°s 5-6, 1934, p. 426.
- UEMURA. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. I*, orig., **75**, Heft. I.

ÉTUDE SUR L'ADSORPTION DU VIRUS DE LA CLAVELÉE ET SUR L'ACTION DU SÉRUM ANTICLAVELEUX

par N. STAMATIN.

*(Institut Pasteur de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de Bucarest, Directeur, professeur AL. VECHIU.)*

En 1913, J. Bridré et A. Boquet [8] ont appliqué au virus de la clavelée la méthode de la sensibilisation de Besredka par le sérum immun [7]. Ils ont observé une atténuation du pouvoir pathogène de ce virus laissé pendant un temps déterminé en contact avec le sérum anticlaveleux. Le vaccin ainsi préparé a donné des résultats satisfaisants. Mais ce procédé d'atténuation n'est pas d'une application générale ; en effet, A. Donatien et F. Lestoquard [10] ont constaté que c'est seulement après un nombre de passages par voie sous-cutanée chez le mouton que les souches peuvent devenir sensibles à l'action du sérum immun. Il s'agit donc de souches de virus ayant des caractères spéciaux, dont la virulence a subi des modifications. Quant aux souches pleinement virulentes, elles ne sont pas sensibles à l'action du sérum anticlaveleux, car, après le séjour de contact elles sont encore capables de provoquer, chez les animaux réceptifs, une maladie à évolution très grave [Al. Ciuca et N. Stamatina (1)]. A la suite de ces constatations, nous avons cru nécessaire de reprendre la question et, en modifiant la technique, de préciser les relations existant entre l'antigène et l'anticorps ainsi que les modifications que le sérum immun peut imposer au virus.

Matériaux utilisés.

VIRUS. — Nous avons employé deux souches de virus : 1° Bucarest et 2° Alger. La souche Bucarest a été isolée en 1931 ; jusqu'au commencement de nos expériences elle avait

(1) Observations inédites.

subi 59 passages sur moutons, dont 49 par voie sous-cutanée. D'une virulence assez réduite au début, la souche devint de plus en plus pathogène, de sorte qu'en 1936, elle pouvait provoquer une lésion locale même à la dose de 0,00001 de claveau centrifugé. A une dose plus forte, elle déterminait, chez les animaux neufs, une maladie généralisée dans 40-50 p. 100 des cas. Plusieurs essais de sensibilisation de ce virus sont restés sans résultat.

La souche Alger a été aimablement mise à notre disposition par MM. A. Donatien et F. Lestoquard, de l'Institut Pasteur d'Alger. Cette souche est sensible à l'action du sérum (2) et beaucoup moins virulente que la souche Bucarest. En effet, sur 16 moutons inoculés par voie sous-cutanée, à la dose de 0 c. c. 003 de claveau, 11 seulement ont réagi, mais il ne s'est pas produit de généralisation.

Dans toutes nos expériences le claveau a été, au préalable, débarrassé, par centrifugation, de tout élément cellulaire.

SÉRUM. — Le sérum anticlaveux provenant de moutons hyperimmunisés avec la souche Bucarest, a été titré sur le mouton. A cet effet, nous avons mélangé la même quantité de virus avec des volumes croissants de sérum : 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 20 de claveau + 0,5, 1, 2 et 4 cent. cubes de sérum. Le volume est complété dans les premiers trois tubes avec de l'eau physiologique jusqu'à 5 cent. cubes. On garde les tubes pendant une heure à la température de la chambre et on inocule au mouton, par voie intra-cutanée, 0 c. c. 1 de chaque mélange (0 c. c. 001 de claveau, c'est-à-dire 100 doses infectantes) Sur un seul animal on peut ainsi comparer et titrer

(2) En partant de cette souche nous avons préparé, d'après la technique de J. Bridré et A. Boquet, un vaccin sensibilisé avec lequel, personnellement ou en collaboration avec MM. Suhaci et Micut, nous avons vacciné 1.278 moutons. 1.075 (85,9 p. 100) ont acquis une immunité solide ; ils ne réagissaient plus à l'inoculation de claveau pur. Chez 79 (6,3 p. 100) on a constaté un faible état d'immunité ; ces animaux réagissaient au claveau pur par la formation d'un nodule et enfin 97 (7,7 p. 100) n'étaient pas immunisés ; le claveau pur provoquait chez eux une pustule à évolution typique. Les animaux à la suite de l'inoculation du vaccin sensibilisé n'ont pas beaucoup souffert. La généralisation de la maladie ne s'est pas produite. La lésion locale consistait en un nodule à évolution sous-cutanée.

TABLEAU I.

NUMÉRO DU MOUTON employé pour le titrage	NUMÉRO DU SÉRUM examiné	ORIGINE DU SÉRUM	DOSE DE SÉRUM mélangée avec 1 cent. cube d'une dilution 1 p. 20 du claveau Bucarest			
			0 c. c. 5	1 cent. cube	2 cent. cubes	4 cent. cubes
6	1	Hyperimmun.	+++ (4)	++	+	— (5)
	2	Hyperimmun.	+	+	—	—
	31	Convalescent.	+++	+++	+++	+++
	32	Convalescent.	+++	+++	+++	+++
7	4 A	Convalescent.	+++	+++	+++	—
	3	Hyperimmun.	—	—	—	—
	4	Hyperimmun.	+++	—	—	—
	5	Hyperimmun.	—	—	—	—
8	10 (1)	Hyperimmun.	—	—	—	—
	11 (2)	Hyperimmun.	—	—	—	—
	12	Sérum cheval (3).	+++	+++	+++	+

(1) Mélange des sérums provenant de dix moutons saignés le 8 décembre 1936.
 (2) Mélange des sérums provenant des mêmes moutons que n° 10 mais saignés le 18 décembre 1937.
 (3) Cheval inoculé, en collaboration avec M. J. Borcila, avec claveau et pulpe claveléuse.
 (4) +, réaction positive; +, bénigne, ++, modérée, +++, grave.
 (5) —, réaction négative.

quatre sérums. Comme la sensibilité du mouton à l'égard de la clavelée est assez variable, le titrage de plusieurs sérums sur le même animal présente des avantages. Dans le tableau I, nous donnons les résultats du titrage de quelques sérums d'animaux hyperimmuns ainsi que de quelques sérums provenant d'animaux convalescents. Ces derniers sérums, en comparaison avec les sérums hyperimmuns, ont toujours une valeur neutralisante inférieure.

ADSORBANTS. — On a utilisé comme fixateur du virus soit le kaolin Poulenc, soit le noir animal « Tierblutköhle Merk. ».

ESSAIS D'ADSORPTION DU VIRUS DE LA CLAVELÉE.

La méthode d'adsorption des virus a été employée par de nombreux auteurs, soit pour déterminer leur nature, soit en

Cette expérience montre que le noir animal, en milieu acide, fixe très bien les particules virulentes ; cette fixation est moins complète à pH 7,6 dans une solution tampon. Par contre, le kaolin, en milieu acide, adsorbe très faiblement le virus claveleux.

La seconde expérience indique mieux encore les conditions de l'adsorption du virus par le noir animal.

EXPÉRIENCE. — Dans un tube à centrifuger, on ajoute 0 gr. 1 de noir animal et 4 cent. cubes de claveau dilué à 1 p. 100 dans de l'eau physiologique à pH 6,5. Le tube, qu'on agite de trente en trente minutes, reste une heure à la température de la chambre. Après une centrifugation de quinze minutes, on décante le liquide surnageant (a) ; le dépôt est mélangé intimement avec 4 cent. cubes d'eau physiologique ayant le même pH ; on opère une nouvelle centrifugation ; on décante le liquide surnageant (b) et le dépôt est repris avec 4 cent. cubes d'eau physiologique (c). Les trois liquides ainsi obtenus sont inoculés, chacun en deux points, par voie intra-cutanée, à 1 mouton.

Voici les résultats :

Liquide a (à la dose de 0 c. c. 1) = 0.

Liquide a (à la dose de 0 c. c. 5) = petit nodule.

Liquide b (à la dose de 0 c. c. 5) = petit nodule.

Suspension de noir animal (culot) c (à la dose de 0 c. c. 1) = grande pustule.

On voit que le virus de la clavelée n'est pas fixé en totalité par le noir animal même en milieu acide, car si l'on augmente la dose du liquide surnageant de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 5 on retrouve le virus. Les germes ne semblent pas adhérer solidement au noir animal : dans les mêmes conditions et sans changer le degré d'ionisation, ils passent, en faible proportion, dans le liquide. Le virus n'est pas détruit par le noir animal, car on le retrouve en abondance dans le culot (3).

Pour fixer les particules de virus d'une dilution donnée, il faut une quantité relativement importante de noir animal. Pour adsorber les éléments virulents contenus dans 0 c. c. 01 de claveau — comme dans les deux premières expériences — il faut 0 gr. 1 de noir animal. Si, pour le même volume de claveau, on réduit la quantité de noir animal — 0 gr. 01 par

(3) Récemment L. Balozet (*C. R. Acad. Sc.*, 1938, 207, 349) a constaté que le virus claveleux peut être solidement fixé par l'alumine hydratée ; il en résulte une atténuation de la virulence du virus adsorbé.

exemple — l'adsorption devient très incomplète et le liquide surnageant est pleinement virulent. L'augmentation de la proportion de noir animal au-dessus de celle que nous avons employée n'est pas recommandable, car les inoculations sont alors trop difficiles à exécuter.

Nous avons répété nos essais tendant à fixer le virus de la clavelée sur le kaolin sans obtenir de résultats positifs. En augmentant la proportion de cette substance par rapport au virus, on constate la disparition de ce dernier du mélange. D'autre part, on constate qu'un mélange de kaolin et de virus actif perd assez vite, même à la glacière, la capacité de provoquer des lésions, en raison de l'action nocive exercée sur le virus.

RELATIONS ENTRE L'ANTIGÈNE ET L'ANTICORPS CLAVELEUX.

C'est un fait acquis que les virus filtrants ne sont pas tués par le sérum immun correspondant. Divers auteurs employant différents moyens ont réussi à mettre en évidence, dans un mélange inactif, sérum + virus, l'agent pathogène spécifique. C'est ainsi que A. Marie [15] récupère, par centrifugation, du matériel virulent d'un mélange sérum-virus rabique inactif ; S. P. Bedson [6], par simple dilution, réactive un mélange sérum + virus herpétique qui s'était montré non pathogène ; C. Todd [22] constate qu'un mélange sérum + virus peste aviaire parfaitement neutre par voie intramusculaire provoque la maladie lors de l'inoculation intraveineuse. C. H. Andrews [2], par la méthode de précipitation des euglobulines au moyen de l'acide carbonique, met en évidence le virus vaccinal dans un mélange neutre. Le virus de la poliomyélite ainsi que le virus vaccinal, peuvent encore être récupérés d'un mélange neutre par cataphorèse (K. P. Olitsky, C. P. Rhoads et P. H. Long [19] et P. Lépine [13]). On constate, toujours en ce qui concerne le virus vaccinal, qu'un mélange neutre pour la peau ne l'est pas lorsqu'il est injecté par d'autres voies (P. Lépine [13], J. Vieuchange [23]). J. Vieuchange [24], en mélangeant un mélange sérum + virus vaccinal inactivé avec des extraits testiculaires — produit qui facilite la diffusion du virus — lui restitue son activité.

Tous ces faits montrent bien que, dans un mélange neutre, le virus est apte à récupérer ses propriétés biologiques ; puisque le virus n'est pas tué par le sérum, le terme de « virulicide » appliqué à celui-ci ne semble donc pas heureusement choisi. C. H. Andrewes, dans cet ordre d'idées, propose l'expression « anticorps protecteurs » qui nous semble plus exacte.

Au cours d'une série d'expériences, dont nous exposerons ci-dessous les résultats, nous avons démontré que le virus de la clavelée, lui aussi, peut être récupéré à partir d'un mélange sérum-virus neutralisé.

EXPÉRIENCE. — On ajoute successivement dans quatre tubes à centrifuger, 0 gr. 1 de noir animal et 1 cent. cube de claveau dilué à 1 p. 24. On agite fortement et on complète dans chaque tube le volume jusqu'à 4 cent. cubes, comme il suit :

Tube n° 1 : 3 cent. cubes d'eau physiologique.

Tube n° 2 : 2 cent. cubes d'eau physiologique + 1 cent. cube de sérum immun.

Tube n° 3 : 1 cent. cube d'eau physiologique + 2 cent. cubes de sérum immun.

Tube n° 4 : 3 cent. cubes de sérum immun.

On garde les tubes pendant une heure à la température de la chambre, en les agitant toutes les trente minutes. Ce délai passé, on inocule à 1 mouton, en deux points, le mélange des tubes n°s 2, 3 et 4. Les quatre tubes sont ensuite centrifugés pendant vingt minutes. Le liquide surnageant du tube n° 1 est inoculé en deux points au même animal ; les autres liquides surnageant sont décantés. Le culot de chaque tube est repris avec 4 cent. cubes d'eau physiologique et les suspensions de noir animal ainsi obtenues sont inoculées séparément, chacune en deux points au même mouton. Les inoculations ont été pratiquées par voie sous-cutanée et la dose administrée en chaque point a été de 0 c. c. 1. Les résultats sont consignés dans le tableau III.

Nous avons noté, dans le tableau, la gravité des lésions en chaque point, ainsi que la rapidité de l'apparition de la lésion.

Il nous semble que la vitesse avec laquelle la lésion variolique prend naissance, est fonction de la quantité des éléments virulents inoculés. On remarque, en effet, que le liquide surnageant du tube n° 1 provoque en un seul point un nodule qui apparaît le septième jour, tandis qu'aux deux points où on a inoculé le culot du même tube la lésion se développe le cinquième jour. En examinant les résultats fournis par les mélanges des autres tubes, on observe une discordance nette entre la gravité et la vitesse d'apparition des lésions provoquées par le mélange total (sérum immun + virus + noir

EXAMINÉ APRÈS	TUBE N° 1				TUBE N° 2			
	Liquide surnageant		Culot		Mélange total		Culot	
	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points
5 jours	—	—	+	+	—	—	—	—
6 jours	—	—	++	++	+	+	—	—
7 jours	+	—	+++	+++	++	++	+	+
9 jours	++	—	++++	++++	++	++	+	+
11 jours	+++	—	+++++	+++++	++	++	+	+

Même légende que dans le tableau I.

RÉSULTATS	TUBE N° 1 48 heures à 15° 0 gr; 05 noir animal				TUBE N° 2 24 heures à 15° 0 gr. 05 noir animal			
	Mouton n° 59		Mouton n° 7		Mouton n° 59		Mouton n° 7	
	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points
Mélange total	+++	+++	—	+	+++	+++	—	—
Culot de centrifugation.	+++	++	+	—	+++	+++	—	—

Comme témoin on inocule un mélange virus + eau physiologique gardé 48 heures à 15° C. Résultat négatif.
Même légende que dans le tableau I.

animal) et celles provoquées par le culot (virus + noir animal + eau physiologique).

On constate que d'un mélange sérum immun + virus + noir animal inactif (tube n° 4), on peut séparer, par centrifugation, le noir animal qui entraîne du virus capable de provoquer une lésion spécifique. Mais, par comparaison, ces lésions sont d'ordinaire moins graves que celles provoquées par le culot du tube n° 1 (virus qui n'a pas subi l'action du sérum). On peut donc conclure que, dans les conditions où nous avons travaillé, le virus de la clavelée n'est pas tué par le sérum anticlaveleux, *mais que le virus qui est resté en contact avec ce sérum se montre moins pathogène.*

TUBE N° 3				TUBE N° 4			
Mélange total		Culot		Mélange total		Culot	
Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points
—	—	+	+	—	—	+	—
—	—	+	+	—	—	++	—
+	+	++	+	—	—	+++	+
+	+	+++	++	—	—	+++	+
+	+	+++	+++	—	—	+++	+
+	+	+++	+++	—	—	+++	+

TUBE N° 3 5 minutes à 15° 0 gr. 05 noir animal				TUBE N° 4 5 minutes à 16° 0 gr. 01 noir animal			
Mouton n° 59		Mouton n° 7		Mouton n° 59		Mouton n° 7	
Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points
+	+++	+	+	+	+	—	—
+	++	+	+	+++	++	++	+

mouton n° 59, +++ ; mouton n° 7, ++.

Dans une autre série d'expériences, nous avons étudié l'influence du noir animal sur l'apparition de la lésion claveluse

EXPÉRIENCE. — Quatre mélanges sérum-virus — 1 cent. cube claveau dilué à 1 p. 24 + 3 cent. cubes sérum immun. — sont gardés à 15° ; le premier tube quarante-huit heures, le deuxième vingt-quatre heures, le troisième et le quatrième cinq minutes. Ensuite, on ajoute dans les trois premiers tubes 0 gr. 05 de noir animal et dans le quatrième 0 gr. 01 de la même substance. Les tubes restent encore trente minutes à 15° et on les agite toutes les quinze minutes. Puis on inocule le mélange total de chaque tube à la dose de 0,1 cent. cube à 2 moutons ; chaque mélange est inoculé à chaque mouton en deux points. On sépare ensuite par centrifugation le noir animal, et le culot, après décantation du liquide surnageant, est repris avec 3,6 cent. cubes d'eau physiolo-

gique. Les suspensions ainsi obtenues sont inoculées de la même façon, aux mêmes moutons. Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

Ce qui se dégage de cette expérience, c'est qu'en ajoutant le noir animal après que le virus est resté en contact avec le sérum anticlaveleux, on n'observe plus le phénomène de neutralisation du mélange. Ce fait est encore plus évident lorsque la quantité de noir ajouté est plus importante.

Au contraire, dans le tube n° 4, où l'on ajoute seulement 0 gr. 01 de noir animal, la neutralisation se produit. Il semble donc que le noir animal ajouté à un mélange neutre agit de telle manière que celui-ci redevient actif. Ce fait ressort encore plus nettement de l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE. — Trois mélanges virus-sérum — 1 cent. cube claveau dilué à 1 p. 24 + 3 cent. cubes sérum immun — sont gardés à la température de 15° pendant quarante-huit heures, puis on inocule 0,1 cent. cube de chaque tube par voie sous-cutanée à 1 mouton. On ajoute ensuite, dans le premier tube 0 gr. 01 de noir animal, dans le deuxième 0 gr. 05 et dans le troisième 0 gr. 1. Les tubes agités de trente en trente minutes, restent encore une heure à la même température, et on inocule le mélange de chaque tube au même mouton, en deux points. Par centrifugation, on sépare le noir animal que l'on reprend avec 3 c. c. 6 d'eau physiologique. Les suspensions obtenues sont inoculées de la même façon au même mouton.

TABLEAU V.

RÉSULTATS	TUBE N° 1 0 gr. 01 noir animal		TUBE N° 2 0 gr. 05 noir animal		TUBE N° 3 0 gr. 1 noir animal	
	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points
Mélange sérum immun + virus	—	—	—	—	—	—
Mélange noir + sérum immun + virus . . .	+	+	++	++	+++	+++
Culot virus + noir. . .	++	+	++	++	+	+
Même légende que dans le tableau I.						

Les résultats obtenus (voir le tableau V) sont tout à fait démonstratifs. Un mélange sérum-virus devient capable de provoquer une lésion si on lui ajoute du noir animal ; les dimensions et la gravité des lésions sont en rapport direct avec

la quantité de noir animal ajouté. Comment pourrait-on expliquer cette inactivité des anticorps dans ces dernières expériences ?

On observe que si l'on ajoute du sérum immun à un mélange noir animal + virus, on peut obtenir une neutralisation parfaite de l'agent pathogène ; dans ce cas, les anticorps exercent leur action ; mais si le noir animal est ajouté à un mélange sérum + virus inactif, le virus reprend son activité, comme si les anticorps faisaient défaut.

Pour les raisons déjà exposées, nous avons fait nos expériences sur le même mouton.

EXPÉRIENCE. — On mélange dans un tube (n° 1) à centrifuger 1 cent. cube de claveau Bucarest dilué à 1 p. 24 dans de l'eau physiologique avec 3 cent. cubes de sérum immun ; après vingt-quatre heures à 20°, on inocule le mélange à la dose de 0,1 cent. cube à 1 mouton, en deux points ; ensuite on ajoute au mélange sérum+virus, 0 gr. 05 de noir animal ; le tube reste encore trente minutes à la même température, puis on inocule le même mouton, à la même dose, en deux autres points.

D'autre part, dans un autre tube (n° 2), on mélange 0 gr. 05 de noir animal avec 1 cent. cube de claveau dilué à 1 p. 24 dans de l'eau physiologique ; on agite fortement et on ajoute 3 cent. cubes de sérum immun. Le tube reste une heure à 20°, en l'agitant toutes les trente minutes. Le mélange total est inoculé au même mouton, en deux points, à la dose de 0,1 cent. cube ; le culot de centrifugation est repris avec 3 cent. cubes d'eau physiologique et la suspension ainsi obtenue est inoculée en deux points au même mouton.

Nous avons effectué la même expérience avec la souche du virus « Alger », dans des conditions tout à fait identiques.

Les résultats de la dernière expérience (tableau VI) montrent que le noir animal joue un rôle différent envers les anticorps, selon qu'il est mis en contact avec le virus, avant ou après le sérum. Dans le premier cas, il n'empêche pas l'action neutralisante du sérum, dans le dernier, il inhibe cette action. Le noir animal favorise donc, à un certain degré, le développement de la lésion claveleuse ; mais il ne semble pas que, à elle seule, cette action puisse expliquer les faits que nous venons de constater. On peut admettre que lors de la mise en contact du noir animal avec un mélange sérum-virus, celui-ci exerce une forte attraction sur les corpuscules virulents et que la faible liaison qui s'est déjà constituée, pendant le contact entre

TABLEAU VI.

RÉSULTATS	TUBE N° 1				TUBE N° 2			
	Mélange de sérum immun + virus		Mélange de sérum immun + virus + noir animal		Mélange de noir animal + virus + sérum immun		Mélange de noir animal + virus adsorbé ayant été en contact avec le sérum immun	
	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points	1 Point	2 Points
Souche Bucarest, mouton n° 74.	—	—	++	++	—	+	+	++
Souche Alger, mouton n° 96.	—	—	—	+	—	—	+	+
Même légende que dans le tableau I.								

l'antigène et l'anticorps, est détruite ; mais, tandis que le virus ainsi récupéré est parfaitement actif, les anticorps semblent avoir été affaiblis. Une telle disparition des anticorps a été observée, dans des conditions différentes, par A. Marie [15]. Cet auteur mélange le virus de la rage avec le sérum correspondant, en proportions déterminées, afin que le mélange soit inactif. Par centrifugation, il sépare le sérum des cellules qui contiennent le virus ; il constate, d'une part, que le culot est virulent et, d'autre part, que le sérum a perdu ses propriétés neutralisantes.

Nous venons de démontrer que l'on peut récupérer le virus pathogène d'un mélange sérum + virus apparemment dépourvu de virulence. Mais, nous avons observé, au cours de nos nombreuses expériences, que le virus qui a subi le contact du sérum provoque des lésions moins graves que celui qui n'a pas été soumis à ce contact. Le même fait résulte de l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE. — 1° 1 gramme de pulpe claveleuse « Alger » est mélangé avec 100 cent. cubes de sérum immun. Après quarante-huit heures de contact, on centrifuge, et le culot de centrifugation est repris avec 100 cent. cubes d'eau physiologique.

2° Dans les mêmes conditions, on mélange 1 gramme de pulpe claveleuse de la même origine avec 100 cent. cubes d'eau physiologique. On procède ensuite de la même manière que précédemment.

Les deux suspensions de pulpe ainsi obtenues sont inoculées à des moutons.

TABLEAU VII.

NUMÉRO du mouton	VOIE de l'inoculation	RÉSULTATS	INOCULATION D'ÉPREUVE	RÉSULTATS
<i>Antigène inoculé : Pulpe claveleuse, 48 heures en contact avec du sérum immun :</i>				
79	Intracutanée.	Nodule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
80	Intracutanée.	Pas de réaction.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pustule.
81	Intracutanée.	Pas de réaction.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pustule.
82	Intracutanée.	Pas de réaction.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Nodule.
83	Sous-cutanée.	Pas de réaction.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pustule.
84	Sous-cutanée.	Pas de réaction.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Nodule.
85	Sous-cutanée.	Nodule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
86	Sous-cutanée.	Nodule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
<i>Antigène inoculé : Pulpe claveleuse, 48 heures en contact avec de l'eau physiologique :</i>				
87	Intracutanée.	Pustule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
89	Intracutanée.	Pustule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
91	Sous-cutanée.	Nodule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
92	Sous-cutanée.	Nodule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
<i>Antigène inoculé : Claveau pur d'Alger :</i>				
93	Intracutanée.	Nodule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.
94	Sous-cutanée.	Pustule.	0 c. c. 1 claveau Bucarest.	Pas de réaction.

La différence d'activité pathogène entre la pulpe qui a été en contact avec le sérum immun et celle qui n'a pas subi ce contact est évidente (tableau VII).

J'ajoute que j'ai essayé de préparer un vaccin en utilisant le claveau adsorbé ; or, même dans ces conditions, le sérum n'atténue pas les souches douées d'un fort pouvoir pathogène.

A notre sens, le sérum diminue peu la virulence initiale d'un virus ; un virus faible peut donner, comme J. Bridré et A. Boquet, A. Donatien et F. Lestoquard l'ont montré, un vaccin présentant toutes garanties d'innocuité ; un virus fort, tout en étant atténué par le sérum immun, garde encore une virulence telle qu'il se montre capable de provoquer une maladie grave. Mais un fait semble certain, c'est que le virus claveloux de n'importe quelle virulence peut être atténué au moyen du sérum immun.

Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer le pouvoir neutralisant du sérum immun à l'égard des virus filtrants : 1° F. M. Burnet et C. H. Andrewes [9] admettent que, sous

l'action des anticorps, les particules des virus deviennent plus sensibles aux facteurs de la lyse et de la phagocytose. Il s'agirait d'une modification du corpuscule virulent d'ordre plutôt physique que biologique.

La deuxième hypothèse, selon laquelle les anticorps exercent leur action sur les cellules réceptives en les rendant réfractaires, nous semble plus plausible, sans exclure la possibilité d'une modification de la particule virulente elle-même. En effet, les expériences effectuées par de nombreux auteurs, ainsi que la constatation que les sérums antivirus sont d'une grande valeur prophylactique, mais d'un faible pouvoir thérapeutique, plaident pour ce dernier point de vue. On ne pourrait expliquer autrement le fait que d'un mélange neutre on réussit presque toujours à séparer les éléments virulents. Dans le même ordre d'idées, C. H. Andrewes [3] constate que si on inocule le virus vaccinal dans une région de la peau où l'on a injecté, vingt-quatre heures avant, une quantité de sérum, la lésion spécifique ne se produit pas ; mais si le sérum est administré après le virus, il n'empêche pas le développement de la lésion. Il est à remarquer que plus on intervient tard avec le sérum, plus les dimensions de la lésion sont grandes. Il s'agit donc, dans le premier cas, d'une immunité passive limitée aux cellules qui ont subi l'action du sérum immun ; dans l'autre, le sérum agit seulement sur les cellules qui ne sont pas encore atteintes par le virus.

In vitro, cette résistance des cellules à la pénétration du virus a été pleinement réalisée par le sérum immun. On a constaté, en effet, que si l'on introduit dans un milieu de culture convenable le sérum et le virus en même temps, le virus ne se multiplie pas ; par contre, le développement est normal si le sérum est ajouté après le virus (Nye et Parker [18], C. H. Andrewes [4, 5], C. Hallauer [12], J. Vieuchange et L. Stamatini [25], J. Vieuchange et J. Mesrobian [26]).

A la lumière de ces résultats, il nous semble que l'atténuation (phénomène correspondant à la sensibilisation de J. Bridré et A. Boquet) du virus de la clavelée qui est resté en contact avec le sérum immun s'explique mieux par une faible adsorption des anticorps que par la modification du virus même. Dans cet ordre de faits, Smith Wilson [21] a déjà

démontré la possibilité de l'adsorption des anticorps par les virus. Il a été également établi que diverses substances sont capables de fixer les anticorps (C. H. Andrewes [2], d'Alessandro et Sofia [4], Kurt Meyer et André Pic [16]).

Conclusions.

1° Dans des conditions que nous avons précisées, le virus de la clavelée peut être adsorbé presque totalement par le noir animal.

2° On peut séparer par centrifugation d'un mélange (noir animal + virus + sérum immun) inactif, le virus qui redevient ainsi capable de provoquer la lésion spécifique.

3° Si l'on ajoute du noir animal à un mélange de sérum + virus inactif, le mélange redevient virulent. Il semble que, dans ces conditions, les anticorps soient mis dans l'impossibilité d'exercer leur action caractéristique.

4° Le virus qui a été en contact avec le sérum immun est, ainsi que J. Bridré et A. Boquet l'ont démontré, moins actif que le virus témoin. Ce fait peut être dû à une adsorption des anticorps par les germes ou à une modification des particules virulentes dans le sens de F. M. Burnet et C. H. Andrewes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D'ALLESSANDRO et SOFIA. *Z. Immunit.* **84**, 1935, p. 237.
- [2] ANDREWES (C. H.). *J. of Path. and Bact.*, **31**, 1928, p. 671.
- [3] ANDREWES (C. H.). *J. of Path. and Bact.*, **32**, 1929, p. 265.
- [4] ANDREWES (C. H.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **10**, 1929, p. 273.
- [5] ANDREWES (C. H.). *J. of Path. and Bact.*, **33**, 1930, p. 301.
- [6] BEDSON (S. P.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **9**, 1928, p. 285.
- [7] BESREDKA (A.). *Ces Annales*, **46**, 1902, p. 918.
- [8] BRIDRÉ (J.) et BOQUET (A.). *Ces Annales*, **27**, 1913, p. 797.
- [9] BURNET (F. M.) et ANDREWES (C. H.). *Zbl. f. Bakt. I orig.*, **133**, 1933, p. 161.
- [10] DONATIEN (A.) et LESTOQUARD (F.). III^e Congrès International de Path. comparée, à Athènes, 1936.
- [11] GILDEMEISTER (E.) et HERZBERG (Kurt). *Zbl. f. Bakt. I orig.*, **91**, 1924, p. 228.
- [12] HALLAUER (C.). *Z. Hyg.*, **116**, 1935, p. 456.
- [13] LÉPINE (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **104**, 1930, p. 385.

- [14] LEVADITI (C.) et NICOLAU (S.). *C. R. Soc. de Biol.*, **88**, 1923, p. 66.
- [15] MARIE (A.). *Ces Annales*, **19**, 1905, p. 1.
- [16] MEYER (Kurt) et PIC (André). *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 401.
- [17] NICOLAU (S.) et GALLOWAY (J. A.). *Ces Annales*, **44**, 1930, p. 673.
- [18] NYE et PARKER. *Am. J. Path.*, **5**, 1929, p. 147.
- [19] OLITSKY (K. P.), RHOADS (C. P.) et LONG (P. H.). *J. exp. Med.*, **50**, 1929, p. 273.
- [20] PYL (Gottfried). *Zbl. f. Bakt. I. orig.*, **121**, 1931, p. 10.
- [21] SMITH WILSON. *J. of Path. and Bact.*, **33**, 1930, p. 273.
- [22] TODD (C.). *Brit. Journ. Exp. Path.*, **9**, 1928, p. 244.
- [23] VIEUCHANGE (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 901.
- [24] VIEUCHANGE (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 953.
- [25] VIEUCHANGE (J.) et M^{me} STAMATIN (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 904.
- [26] VIEUCHANGE (J.) et MESROBEANU (J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 951.
- [27] STAMATIN (N.). *C. R. Soc. de Biol.*, **124**, 1937, p. 984, et **124**, 1938, p. 635.

DÉVELOPPEMENT POSSIBLE DU VIRUS RABIQUE DANS L'ORGANISME DE LA TIQUE DU CHIEN (*RHIPICEPHALUS SANGUINEUS*)

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

Le virus rabique n'a été que bien rarement décelé dans le sang. Une fois seulement, Pasteur parvint à donner la maladie à un chien à l'aide du sang d'un lapin mort de rage, et il est classique de rappeler que la transfusion à un chien sain de la totalité du sang d'un chien enragé échoua entre les mains de Paul Bert. Ultérieurement, A. Marie a été plus heureux. A côté d'une vingtaine d'essais infructueux, il a pu recueillir trois observations positives. Quelques faits semblables ont été notés par Galli-Valerio, par Bordoni-Uffreduzzi, par Konradi. La littérature médicale ne porte trace, à notre connaissance, d'aucun autre résultat positif. La fréquence relative du passage du virus rabique à travers le placenta nous a, à un moment, fait supposer qu'il se trouvait dans le sang plus fréquemment qu'il n'était admis, mais que sa présence y était éphémère et que les échecs étaient dus à ce qu'il n'était pas recherché en temps opportun. Nous avons donc inoculé sous la dure-mère d'une douzaine de lapins un virus de rue amenant la mort en quatorze jours. Chaque jour, à partir du deuxième, l'un d'eux était sacrifié et la totalité du sang inoculée dans les muscles de la nuque de 2 cobayes. Aucun ne prit la maladie. La très grande rareté des constatations positives, alors même que le sang est injecté en quantité massive, souligne l'intérêt des deux observations qui suivent où le sang n'ayant pas été prélevé directement sur l'animal enragé, mais chez des tiques qui le parasitaient, le virus a pu être mis en évidence dans une minime quantité de liquide.

OBSERVATION I. — *Chien en incubation de rage des rues inoculé avec du virus fixe. Evolution d'une rage de rue à forme paralytique. Inoculation d'un lapin avec le sang de tiques recueillies la veille de la mort. Résultat positif.*

Le 2 mai 1935, on inocule sous la dure-mère d'un chien kabyle couvert de tiques, 0 c. c. 5 d'une émulsion à 1 p. 40 de virus fixe. Cinq jours plus tard, on constate les premiers symptômes d'une rage paralytique qui n'attire l'attention par aucune particularité et ne paraît différer en rien de la rage déterminée par le virus de passage employé à l'Institut. Le 9 mai (septième jour), alors que l'animal est entièrement paralysé, incapable de relever la tête et le cou et étendu en décubitus latéral complet, on prélève sur lui 18 tiques (*Rhipicéphalus sanguineus*) choisies parmi les plus volumineuses. On retire à la pipette le sang qui gonfle leurs diverticules digestifs. Ce sang, d'aspect noirâtre, de consistance épaisse, muqueuse, est dilué dans de l'eau physiologique et deux lapins reçoivent dans l'épaisseur des muscles cruraux droits, chacun 15 cent. cubes de la dilution. Mort du chien le 10 mai (huitième jour). Des deux lapins inoculés, l'un succombe le lendemain à une septicémie gangréneuse. L'autre demeure vivant et bien portant jusqu'au 24 juin. Ce jour-là (quarante-sixième après l'inoculation), il présente une paralysie du train postérieur qui a tous les caractères d'une paralysie rabique. Le 27 juin (quarante-septième jour), l'animal est étendu en décubitus sterno-abdominal. Le bipède antérieur, écartelé, est atteint à son tour. L'animal est incapable de se tenir debout. Le 26 (quarante-huitième jour), le lapin, entièrement paralysé, agonise. Mort à 15 heures. L'urine renferme 25 grammes de glucose par litre. Un fragment de corne d'Ammon est émulsionné à 1 p. 50 dans de l'eau physiologique et on inocule 5 c. c. 3 de cette émulsion sous la dure-mère de 2 lapins et de 1 cobaye. Les 2 lapins succombent le quatorzième jour à la rage paralytique, le cobaye le quinzième à la rage furieuse. De nombreux passages effectués à dater de ce moment par le lapin (11 lapins), le cobaye (4 cobayes), le chien (2 chiens), révèlent une symptomatologie qui est beaucoup plus celle de la rage furieuse que celle de la rage paralytique. De nombreux corps de Negri sont rencontrés.

La souche est envoyée à M. le professeur Levaditi qui a la grande amabilité d'en faire, avec M^{lle} Schoen, une étude histologique et expérimentale très complète. Leur conclusion est, comme la nôtre, en faveur du virus de rue. Cependant, c'est du virus fixe qui avait été inoculé au chien porteur de tiques. Le passage par la tique aurait-il déterminé une régression du virus ? Un instant émise, cette séduisante hypothèse n'a pas été retenue. Il a semblé plus simple, et à coup sûr moins aventureux, d'admettre qu'en provenance de la fourrière municipale, le chien se trouvait en incubation de rage des rues lorsqu'il fut inoculé avec du virus fixe et que cette rage des

rués évolua chez lui sous une forme paralytique impossible à distinguer cliniquement de la rage déterminée par le virus de passage.

Il y a au Maroc des années à tiques et des étés où celles-ci sont rares. Nous avons dû attendre pendant deux ans des circonstances favorables nous permettant de reprendre nos expériences. En 1938, un résultat positif très analogue au précédent a été obtenu.

OBSERVATION II. — Chien atteint de rage à virus de rue. Inoculation au cobaye du contenu presque uniquement sanguin de l'appareil digestif de tiques recueillies la veille de la mort. Résultat positif.

Le 16 avril 1938, un chien est inoculé sous la dure-mère avec une émulsion de virus de rue roumain, dû à l'amabilité du Dr Démètre Jonnesco, et tuant le chien en sept-huit jours. Le 22 avril (sixième jour), l'animal est déjà couché et complètement paralysé. On prélève sur son corps 10 tiques (*Rhipicephalus sanguineus*) bien gorgées de sang. Les acares sont introduits dans un ballon de 1 litre dans lequel on a versé 200 cent. cubes d'eau oxygénée au quart. Après agitation durant cinq minutes, l'eau oxygénée est renouvelée ; elle est renouvelée de même après une deuxième agitation des tiques dans l'antiseptique. L'opération est ainsi répétée cinq fois de suite, puis les acares sont passés deux fois dans l'eau physiologique stérile et essorés au buvard. Introduits dans le fond d'un verre conique, ils subissent, un par un, une pression exercée à l'aide d'une baguette de verre. De cette pression résulte un éclatement de l'abdomen d'où s'écoule une petite masse rouge noirâtre, muqueuse, formée du sang ingéré qui a déjà subi des transformations digestives. Il s'y mêle quelques débris épithéliaux provenant des diverticules digestifs eux-mêmes. Le reste de l'animal (carapace, membres) ayant été retiré du verre, le contenu des appareils digestifs des dix Rhipicephales sont réunis, additionnés de leur volume de sérum physiologique et inoculés dans l'épaisseur des muscles cruraux de 4 cobayes, chacun d'eux recevant 1 cent. cube de dilution. De ces 4 cobayes, 1 est mort le lendemain de septicémie ; 2 autres sont demeurés vivants et bien portants. Le quatrième présente, le 2 novembre (cent quatre-vingt-quatorzième jour), tous les symptômes de la rage furieuse la plus typique. Il parcourt sans arrêt sa cage, la bave à la bouche, le regard incendiaire et pousse des gloussements très différents du cri habituel du cobaye. Il s'attaque au grillage et réagit avec une extrême violence à toutes les excitations sensorielles. Il est trouvé mort le 3 au matin (cent quatre-vingt-quinzième jour). La corne d'Ammon ne montre aucun corps de Negri mais, des passages ayant été faits avec le bulbe dans le cerveau d'un lapin et de 6 cobayes, tous ces animaux ont succombé dans les délais habituels à la rage furieuse la plus caractérisée.

Négligeant les paralysies qui n'ont pas, par les passages,

fait la preuve de leur nature rabique, ces deux constatations de la transmission de la rage par du sang de tiques sont les seules que nous retiendrons ici. On connaît les accidents paralytiques déterminés cliniquement chez l'homme, cliniquement et expérimentalement chez les animaux, par différentes espèces de tiques. Ceux qui ont été, dans nos expériences, déterminés par *Rhipicephalus sanguineus* feront l'objet d'un travail spécial. Bien qu'une trentaine de recherches n'aient donné que deux résultats positifs, il nous est apparu nettement qu'il était plus facile de déceler la présence du virus rabique dans une petite quantité de sang recueillie chez des tiques que dans une quantité beaucoup plus considérable prélevée chez l'animal enragé lui-même. De quelles interprétations cette différence de comportement est-elle justiciable ? La succion exercerait-elle sur le virus rabique circulant dans le liquide sanguin une action spéciale d'attraction ? S'il en était ainsi, les sangsues exerçant une succion beaucoup plus énergique que les tiques, il devrait en résulter une attraction du virus rabique sensiblement plus forte. Or, 28 sangsues (*Limnatis nilotica*), gorgées sur 8 chiens rabiques, ont fourni, par ponction des cæcum stomacaux, chacune environ 1 cent. cube de sang. Ce sang a été injecté soit sous la dure-mère, soit dans les muscles de 30 lapins et de 8 rats. Toutes ces expériences ont fourni un résultat négatif. Celui-ci est de nature à la fois à montrer le rôle négatif de la succion et à laisser supposer que tous les invertébrés sanguisuges ne se comportent pas à l'égard du virus rabique de façon identique, quelque chose de spécial se passant chez la tique. On est ainsi amené à se demander si le virus ne se développerait pas dans l'organisme de cet Ixode, moins très probablement dans le sang apparaissant déjà très modifié et digéré en partie lorsque, pour l'inoculer, on l'extrait à la pipette que dans les cellules épithéliales des revêtements des diverticules digestifs eux-mêmes. Telles les Rickettsies se développent abondamment dans les cellules épithéliales du tube digestif des poux vecteurs du typhus. Loin de nous, du reste — est-il besoin de l'ajouter ? — l'opinion qu'une tique, même si elle venait à piquer l'homme aussitôt après s'être détachée du corps d'un animal rabique, serait capable d'inoculer la maladie ! Il semble au contraire que, parvenu dans

l'organisme de la tique, le virus rabique se soit engagé dans une impasse. On ne voit pas comment il serait susceptible de repasser de l'invertébré au mammifère. Intéressant au point de vue doctrinal, le développement possible du virus rabique chez la tique l'est ainsi moins au point de vue pratique. La tique est certainement très éloignée de prendre rang parmi les réservoirs du virus de la rage.

Le Gérant . G. MASSON.

